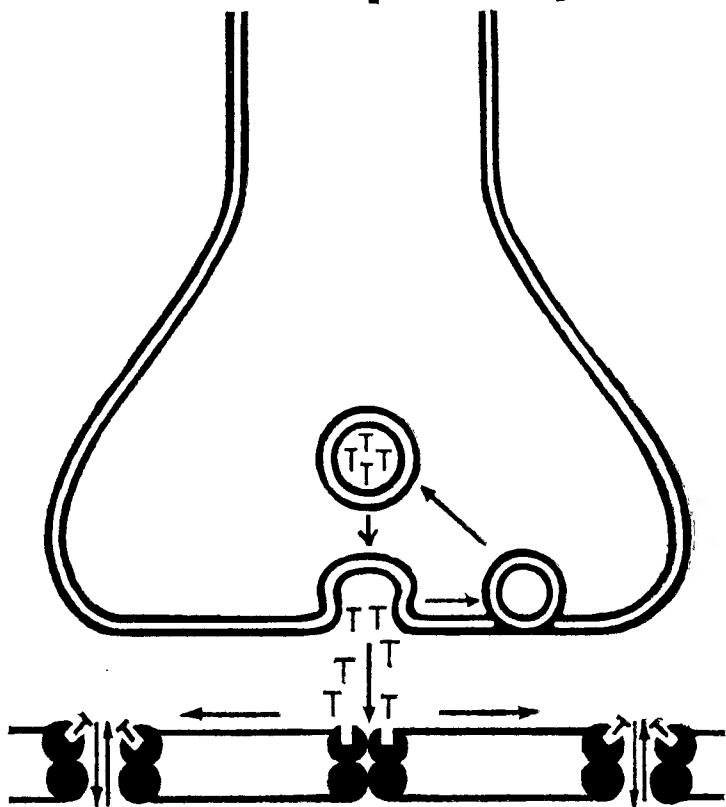


Ф. Хухо

НЕЙРОХИМИЯ

Основы и принципы



Издательство «Мир»

НЕЙРОХИМИЯ

Основы и принципы

Ferdinand Hucho

NEUROCHEMISTRY
FUNDAMENTALS AND CONCEPTS

Translated by Margaret Dickins

VCH

Ф. Хухо

НЕЙРОХИМИЯ
Основы и принципы

Перевод с английского
д-ра хим. наук Е. В. Гришина
и канд. хим. наук В. В. Оноприенко



Москва «Мир» 1990

ББК 28.070
Х98
УДК 547.9+577.1

Х98 Хухо Ф.
Нейрохимия: Основы и принципы: Пер. с англ. — М.:
Мир, 1990. — 384 с., ил.
ISBN 5-03-001030-0

Учебное пособие автора из ФРГ, в котором обобщены современные представления о нейрохимических процессах, лежащих в основе функциональной деятельности нервной системы. Обсуждаются вопросы, касающиеся связи нейрохимии с развитием таких смежных дисциплин, как нейрофизиология, нейрофармакология, нейроэндокринология. Впервые приводятся данные об использовании генетических подходов в нейрохимии.

Для студентов и преподавателей университетов и медицинских вузов, а также для биохимиков, фармакологов, врачей, специалистов в области молекулярной биологии.

X 1903010000-225
041(01)-90 105—90

ББК 28.070

Редакция литературы по химии

ISBN 5-03-001030-0 (русск.)
ISBN 3-527-25989-9 (англ.)
ISBN 3-89573-225-4 (англ.)

© VCH Verlagsgesellschaft mbH, D-6940
Weinheim (Federal Republic of Ger-
many), 1986
© перевод на русский язык, с измене-
ниями, Гришин Е. В., Оноприен-
ко В. В., 1990

ПРЕДИСЛОВИЕ К РУССКОМУ ИЗДАНИЮ

Последнее десятилетие ознаменовалось развитием и становлением нового научного направления биологии нервной ткани — нейрохимии. А сегодня мы вполне обоснованно можем говорить уже о бурном и стремительном развитии этой науки, причем, пожалуй, именно достижения в нейрохимии могут служить тем своеобразным индикатором, который поможет оценить уровень наших знаний о мозге, его структуре и функции его компонентов.

Автор предлагаемой читателю книги профессор Свободного университета Западного Берлина Фердинанд Хухо хорошо известен в кругу специалистов в области биофизики и биохимии мембран. Автор предпринял, и вполне удачно, смелую попытку, не вдаваясь в частности и не стремясь полностью охватить все достижения, осветить в своей книге становление, развитие и современное состояние нейрохимии, обращая особое внимание на описание молекул и химических превращений, обуславливающих работу нервной клетки.

В книге четко сформулированы основные проблемы и достижения нейрохимии, выделены ключевые вопросы. Обсуждение построено с привлечением большого числа примеров разнообразных объектов, процессы функционирования нейроклеток рассмотрены во взаимосвязи с другими сторонами деятельности живых организмов. В книгу включен прекрасный иллюстративный материал, помогающий усваивать довольно непростые концепции и гипотезы, касающиеся наиболее сложных высших функций живой природы — работы нервной системы. Строение и функции нейрональных мембран, механизмы синаптической передачи и характеристика рецепторов нейромедиаторов, ионные каналы и активный транспорт — вот наиболее важные и существенные проблемы, которые подробно рассмотрены. В книге хорошо отражена связь нейрохимии с развитием других смежных направлений — нейрофизиологии, нейрофармакологии, нейроэндокринологии и т. д.

Книга Хухо «Нейрохимия» безусловно окажет неоценимую помощь студентам и аспирантам, осваивающим этот сложный курс, а также специалистам, работающим в области нейрохимии, молекулярной биологии, биофизики, фармакологам и врачам, занимающимся научными исследованиями.

Е. Гришин

ОПРЕДЕЛЕНИЕ НЕЙРОХИМИИ НА ПРИМЕРЕ ЗРИТЕЛЬНОГО ПРОЦЕССА

ПРЕДИСЛОВИЕ

Нейрохимия, вероятно, относится к наиболее быстро развивающимся направлениям науки о живом. Первоначально я планировал издать в переводе на английский язык мою же книгу, написанную шесть лет назад и вышедшую на немецком языке в ФРГ. Но вскоре для меня стало совершенно ясно, что для нового издания необходимо нечто большее, чем простой перевод и небольшие дополнения. Ведь к этому моменту стала применяться техника рекомбинантных ДНК, были сформулированы новые концепции механизма передачи сигнала через мембраны, были охарактеризованы некоторые нейромедиаторные рецепторы, что позволило уточнить до того не очень полные гипотезы. Как только все это было принято мною во внимание, книга «Нейрохимия. Принципы и концепции» не могла не стать иной. Однако по существу мой подход как автора не изменился: я хотел составить легко читаемый обзор достижений нейрохимии, а не исчерпывающий справочник. Адресована книга биохимикам, биологам, химикам, биофизикам, фармакологам и студентам-медикам, желающим ознакомиться с интереснейшими проблемами нейрохимии, находящимися на границе, на стыке многих научных направлений.

В первую очередь я хочу выразить благодарность д-ру Маргарет Дикинс, вклад которой в создание этой книги оказался значительно большим, чем просто перевод на английский язык. Особо признателен я моим коллегам, которые поддерживали лабораторию в рабочем состоянии все то время, пока я был отвлечен от научной работы и занимался сборанием фактического материала и написанием самой книги. Я благодарю также моих студентов, с помощью которых я мог проверить доступность изложения научных концепций, лежащих в основе последующих двенадцати глав. И наконец, я хочу поблагодарить издательство, и особенно д-ра Крауса, проявившего поистине завидное терпение, так как я ни разу не получил отказа включить в книгу ни одного из тех многочисленных дополнений, без которых книга устарела бы еще в процессе ее издания, но которые возникали, к сожалению, прямо-таки в последние минуты.

Берлин, март 1986 г.

Фердинанд Хухо

При оценке возможностей нейрохимии прежде всего необходима осторожность. За последние четверть века несомненные успехи молекулярной биологии настоятельно повысили самонадеянность биохимиков, что некоторые из них уверовали в возможность разрешить биохимическими методами или на молекулярном уровне буквально все загадки живой природы. Так, при изучении механизма наследственности делались попытки рассматривать мозг человека как еще одну молекулярную головолу. По мере того как решались основные проблемы молекулярной генетики и все меньше возможностей оставалось для новых фундаментальных открытий, ведущие специалисты в области молекулярной биологии стали сосредоточивать свои интересы на нейробиологии. Здесь, однако, молекулярный подход имеет ограничения. Я не хочу выступать в роли защитника некоего неовитализма, но описание ограничений и возможностей нейрохимии может стать, по-моему, хорошим способом дать определение этой научной дисциплины, а сопоставление молекулярной генетики с молекулярной биологией прекрасно это иллюстрирует.

Основна молекулярной генетики — молекула дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК). Генетическая информация зашифрована в молекуле ДНК с помощью кода, который мы «скромно» называем универсальным. Это означает, что если известно, как происходит передача наследственной информации в одной клетке, то известен также молекулярный механизм этой передачи в любых других клетках, причем не только того же органа или организма, но и вообще у всех живых существ. Имеются, конечно, различия в регуляции наследственности у прокариотов и эукариотов, но общая ситуация прекрасно определена Моно: «Что применимо к *E. coli*, применимо и к слону». Наследственность — это биохимия ДНК.

Биохимическими методами можно изучать механизм переноса информации, но не саму информацию

Предметом изучения в нейрохимии является основная составная часть всех нервных систем — нервная клетка, или нейрон. Почему же мы не говорим, что функционирование нервной систе-

мы — это биохимия нейронов? Дело в том, что такое определение не включало бы высшие жизненные функции нервной системы: ощущение, восприятие, мышление, обучаемость и сознание. Все эти функции, очевидно, обусловлены не просто биохимическими свойствами единичных нейронов, а возникают в результате интеграции сотен миллионов нейронов в сложные системы. Биохимический анализ мозга человека сам по себе дает не больше для понимания функции мозга, чем анализ красителей для оценки живописи. Несмотря на бесконечное разнообразие нейронов и сложность их функций, биохимия этих клеток весьма стереотипна и работа единичного нейрона настолько проста, что кажется почти примитивной по сравнению с его функционированием в составе нервной системы.

Позвольте мне проиллюстрировать этот тезис. Истинная функция нейрона — передача сигналов. Однако мы увидим (гл. 5), что в нервной системе существуют только два типа сигналов: электрические и химические. Важно отметить, что сам сигнал содержит очень мало информации. Его специфичность зависит от мест возникновения и приема, т. е. от клеток органов, между которыми он передается. Так, например, причина того, что мы слышим, а не видим звук, кроется не в электрическом или химическом коде нервного импульса, а в том, что зрительная кора затылочной доли головного мозга соединена с нейронами сетчатки, а не уха. При электрическом или механическом, а не оптическом воздействии на сетчатку мы также будем «видеть». Любой, у кого «искры из глаз сыпались» после сильного удара, может подтвердить это. Следовательно, качественно информация, передаваемая нейроном, зависит исключительно от специфичности его соединения, и только количественная характеристика содержится, по-видимому, в самом сигнале: сильный стимулятор посылает больше нервных импульсов от рецептора к воспринимающему органу, чем слабый. Опять же нервные импульсы, скажем, оптической или акустической области нашей нервной системы практически неотличимы от нервных импульсов в совершенно других системах, например у более примитивных форм жизни. Сами по себе эти импульсы очень мало информативны даже для узкого специалиста. Таким образом, нейробиолог, изучающий биохимию нейронов, может выяснить только механизм возникновения и передачи сигналов, специфическое содержание (смысл) сигналов недоступно его методам. Он может изучать общие молекулярные реакции, лежащие в основе обработки сигналов, но не результаты этой обработки, т. е. «информацию».

Напротив, специалист в области молекулярной генетики может не только описать биохимически механизм транскрипции и трансляции генетической информации, но и саму информацию,

например указать набор ферментов, который делает клетку печени клеткой печени, а нейрон нейроном. Здесь, однако, следует внести уточнение: функции нервной системы определяются не только биохимией единичных клеток, но и биохимией эмбрионального развития сети нейронов, метаболизмом нервной системы, интеграцией гормонального действия, взаимодействием между частями нервной системы, а также между нервными клетками и их окружением, например взаимодействием с глияльными клетками и т. д. Следовательно, имеется множество нейробиологических объектов, аспекты нейробиологии которых далеко выходят за рамки биохимии отдельного нейрона.

Нейроны имеют столь разнообразные функции, что следует предположить существование процесса адаптации единичных нейронов к их специфическим функциям. Центральная нервная система, например, в основе своей — более дифференцированный орган, чем печень, где различные функции распределены между относительно немногими типами клеток. Хотя нейроны с их стереотипными сигналами проявляют много одинаковых основных функций, определенно имеются также высокоспециализированные нейроны с особой, присущей только им нейробиологией. Вначале, как это традиционно для нового раздела науки, мы сосредоточимся на общих свойствах предмета изучения, т. е. на свойствах нейронов.

Нейробиология сетчатки не описывает процесс видения изображений

Вместо того чтобы говорить общие слова о возможностях и ограничениях нейробиологии, лучше привести конкретный пример. Обратимся к «зрению» как к типичной сложной функции нервной системы. Зрительный процесс многостадийный: световая энергия улавливается, превращается в нервный импульс и передается далее в этой форме. Нервные импульсы должны быть преобразованы, т. е. интегрированы, с тем, чтобы передать определенную информацию. Только первые две стадии можно описать как исключительно молекулярные нейробиологические процессы, а они не представляют собой «зрения» в смысле восприятия изображений. Мы видим не глазами, а мозгом.

Первая стадия: витамин А-альдегид поглощает свет

Франц Боль в 1877 г. открыл зрительный пурпур — родопсин сетчатки глаза, и в последующие 100 лет была развита полная схема его функционирования. Сигналы, поступающие из окружающей среды, воспринимаются специальными структурами

наших органов чувств — световыми рецепторами (фоторецепторами) — и передаются в центральную нервную систему. Фоторецепторами зрительных сигналов являются специализированные клетки — палочки и колбочки — сетчатки глаза, расположенной на дне глазного яблока. Хехт (1931 г.) показал, что один единственный фотон может запустить нервный импульс, а его ученик Г. Вальд (1933 г.) выяснил главную стадию этого молекулярного процесса: он обнаружил в составе клеток сетчатки витамин А, структура которого уже была установлена к этому времени Каррером. Вскоре Вальд (1934 г.) сформулировал свою теорию циклического процесса фоторецепции (рис. 1.1а), которая в основном принята и в настоящее время.

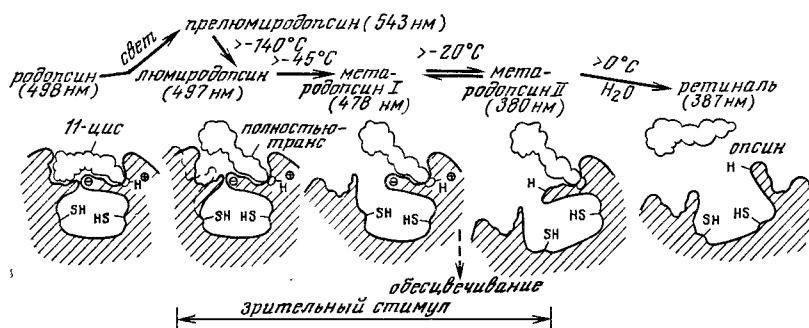


Рис. 1.1а. Обесцвечивание родопсина. Вслед за фотоизмеризацией ретиналя (11-цис-ретиналь → полностью-транс-ретиналь), которая индуцирует последовательность конформационных изменений опсина, происходит диссоциация комплекса белка (опсина) и хромофора. Индивидуальные конформации были стабилизированы при очень низких температурах и затем их удалось охарактеризовать по спектрам поглощения. Нервные импульсы возникают до диссоциации (обесцвечивания), вероятно, на стадии метародопсина II (по Г. Вальду).

Родопсин состоит из белка *опсина* (рис. 1.1б) и связанного с ним хромофора, являющегося альдегидной формой *витамина А* (*ретиналем*); соотношение этих составных частей в молекуле родопсина 1:1. У наземных и морских позвоночных, которые приспособились к различным условиям освещенности окружающей их среды, имеются различные хромофоры, обозначаемые как ретиналь I и ретиналь II (рис. 1.2). И палочки, и колбочки, несмотря на разные спектры поглощения (рис. 1.3), содержат, однако, в своем родопсине один и тот же ретиналь, различия в спектрах обусловлены белковым компонентом. С помощью своей альдегидной группы ретиналь образует шиффово основание с ϵ -аминогруппой лизинового остатка опсина и, таким образом, ковалентно связывается с этим белком. Главная стадия фоторецепции состоит в использовании поглощенной световой энергии для изомеризации ретиналя: 11-цис-ретиналь (рис.

1.2) переходит в полностью-транс-ретиналь. Это приводит к дестабилизации родопсинового комплекса и его гидролизу до ретиналя и опсина. Спектроскопическими методами установлено еще несколько промежуточных стадий (рис. 1.4), а биохимически показано также, что белок претерпевает ряд конформационных превращений. Так, в нативном родопсине основание Шиффа не может быть восстановлено борогидридом натрия NaBH_4 , и только на стадии метародопсина II оно становится

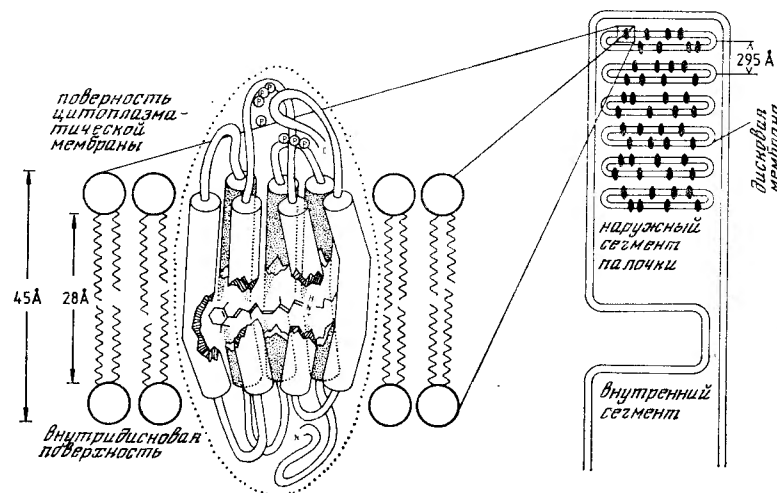


Рис. 1.1б. Поперечное сечение внешнего сегмента палочки. Схема приведена без соблюдения масштаба, так как имеется 600—2000 дисков на палочку и $2 \cdot 10^4$ — $8 \cdot 10^5$ молекул родопсина на диск в зависимости от вида организма. Слева показана схематическая модель с увеличенным общей структуры родопсина и его ассоциация с липидным бислоем дисковой мембраны внешнего сегмента палочки. Родопсин изображен в виде удлиненного пучка довольно нерегулярных спиралей, погруженных в липидный бислой. Схематически показан центр связывания 11-цис-ретиналя, ориентированный примерно параллельно плоскости мембраны. Буквой Р отмечены семь известных центров фосфорилирования. (Воспроизводится с разрешения Elsevier Science Publishers [TIBS, 1983, vol. 8, p. 128].)

доступным действию этого реагента. Одна из аминокрупп белка, изоэлектрическая точка которого (6,4) заставляет предположить, что речь идет об имидазольном кольце гистидина, может быть оттитрована после облучения. Конформационно-зависимые изменения реакционной способности демонстрируют также тильные группы опсина. Таким образом, свет вызывает, очевидно, изменения в структуре белка посредством изомеризации ретиналя.

Мы еще вернемся к диссоциации родопсина, которая является решающим событием при протекании второй стадии зри-

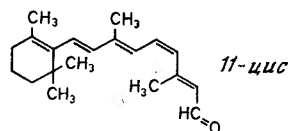
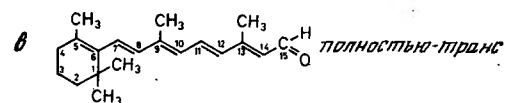
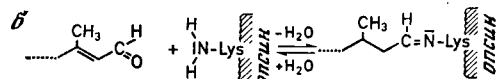
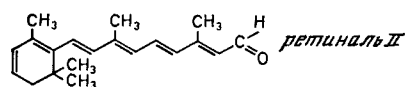
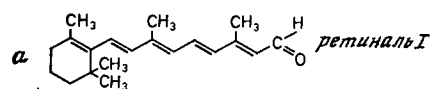


Рис. 1.2. *а* — ретиаль — хромофор родопсина. Ретиаль I встречается у наземных позвоночных, ретиаль II — у морских позвоночных; *б* — ковалентное связывание ретиналя и опсина с образованием основания Шиффа; *в* — полностью-транс- и 11-цис-ретиаль.

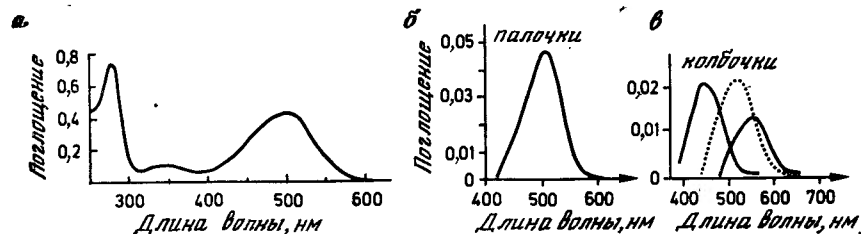


Рис. 1.3. *а* — спектр поглощения родопсина из палочек; *б* — сопоставление спектров родопсина в палочках и в трех типах колбочек, ответственных за цветовое зрение; хотя хромофор во всех клетках один и тот же, спектры различны.

тельного процесса — превращении света в нервный импульс. Цикл Вальда следует теперь завершить описанием регенерации нативного родопсина из его обесцвеченной формы (рис. 1.5). Частично такой процесс, по-видимому, осуществляется ферментативным восстановлением ретиналя до ретинола (витамина А) с его последующей изомеризацией (полностью-транс-ретинол → 11-цис-ретинол), окислением до 11-цис-ретиналя и рекомбинацией до родопсина. Параллельно этому пути, который идет в темноте, свет может сам вызывать регенерацию 11-цис-ретиналя (рис. 1.5). Второй путь регенерации, возможно, катализируется

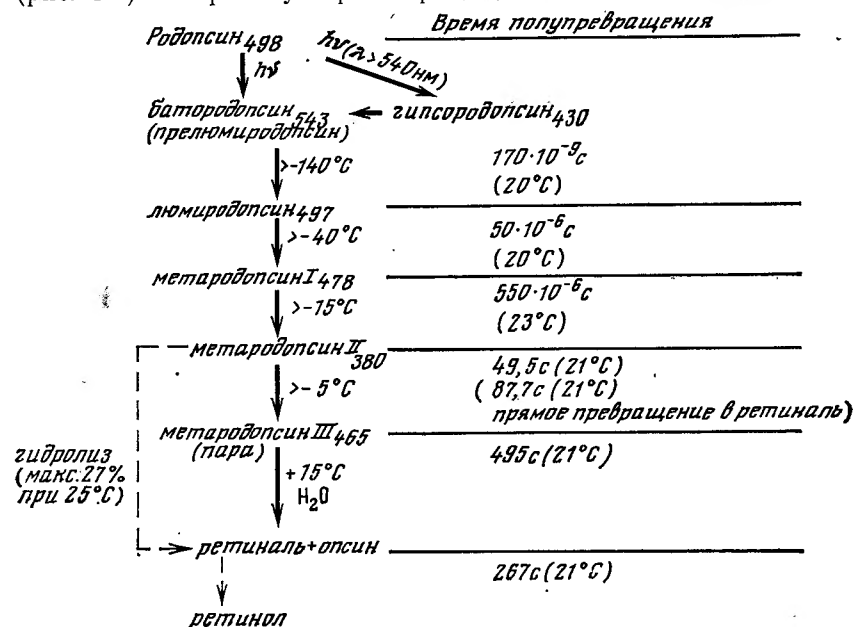


Рис. 1.4. Последовательность промежуточных стадий и времена полупротекания этих стадий в процессе обесцвечивания родопсина из сетчатки глаз лягушки [2].

компонентом мембраны палочек — фосфатидилэтаноламином (PE). Однако оба этих пути плохо изучены, и здесь, как и в ряде других аспектов фоторецепции, мы все еще бродим в потемках!

Вторая стадия: запуск нервного импульса (трансдукция)

Все описанные события начальной стадии первичного процесса восприятия света являются биохимическими, вторая стадия также может быть описана на молекулярном уровне. Здесь мы

сосредоточимся в основном на рассмотрении одного из двух фоторецепторов позвоночных — палочек. Колбочки, ответственные за цветное зрение, исследованы хуже, и обсуждение происходящих в них процессов мы пока отложим. Палочки выполняют функцию распознавания контрастов яркости и участвуют в зрительном процессе главным образом при слабом освещении. Глаз человека содержит $\sim 120 \cdot 10^6$ палочек и $\sim 6,5 \cdot 10^6$ колбочек. Палочка (рис. 1.6) состоит из наружного и внутреннего сегментов, связанных жгутиками. Во внутреннем

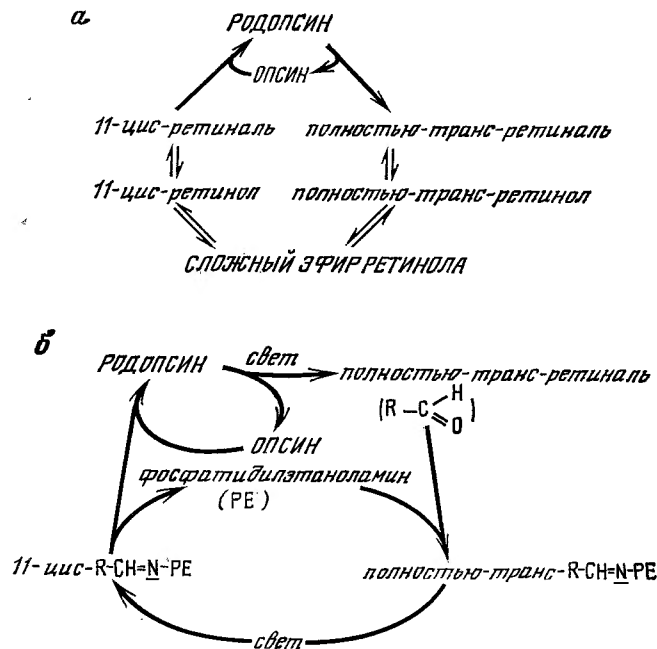


Рис. 1.5. Регенерация 11-цис-ретиная. а — ферментативная регенерация; б — возможный механизм индуцированной светом регенерации с участием фосфатидилэтаноламина (PE).

сегменте расположены митохондрии, которые обеспечивают метаболическую активность клетки, и клеточное ядро. Наружный сегмент содержит стопку бислойных мембран (1000—2000 стопок на палочку), называемых дисками, в которые встроены многочисленные молекулы родопсина. Родопсин — гликопротеин, содержащий 14 ковалентно связанных остатков моносахаридов (5 остатков N-ацетилглюкозамина и 9 остатков маннозы). Он нерастворим в воде, но действием мягких детергентов может быть отделен от своего липофильного окружения в мем-

бране без серьезного нарушения структуры. Каждый сегмент палочки человеческого глаза содержит $\sim 10^7$ молекул родопсина с $M 41\,000$, следует отметить, что у лягушки содержание родопсина достигает $\sim 10^9$ молекул/сегмент, т. е. концентрация родопсина в ее палочках удивительно высока (~ 2 mM). Первичная структура родопсина установлена [1]; показано, что он представляет собой истинный мембранный белок, пронизывающий мембрану насквозь. В свою очередь отсюда следует, что *in situ* родопсин имеет вытянутую конформацию, поскольку, будь он

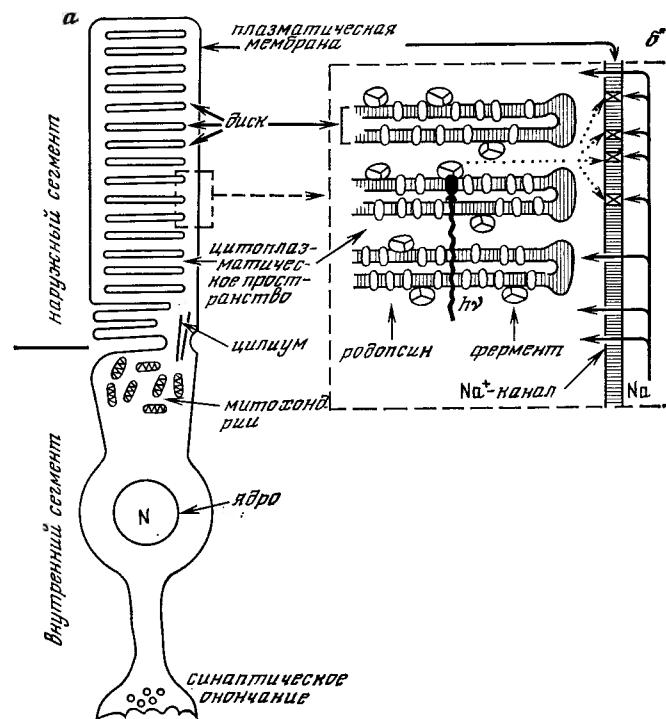


Рис. 1.6. Структура палочки. а — клетка в целом; б — внешний сегмент с участками мембраны диска, содержащей родопсин (см. также рис. 1.16). (Предоставлено Г. Кюном.)

глобулярным, диаметр его молекулы был бы ~ 4 нм, что меньше толщины мембраны. Как бы то ни было, его высокая концентрация сама по себе должна влиять на физические характеристики бислойной мембраны, в особенности на ее электрические свойства.

Вслед за поглощением родопсином фотона, т. е. первой стадией зрительного процесса, происходит изменение мембранного

потенциала клеток: в результате различного распределения ионов по обе стороны плазматической (клеточной) мембраны палочек (гл. 5) возникает разность потенциалов ~ 40 мВ между внешним и внутренним (отрицательно заряженным) пространством клетки. Это так называемый потенциал покоя, при действии света он увеличивается. Новый временно возросший мембранный потенциал (гиперполяризация) называется *рецеп-*

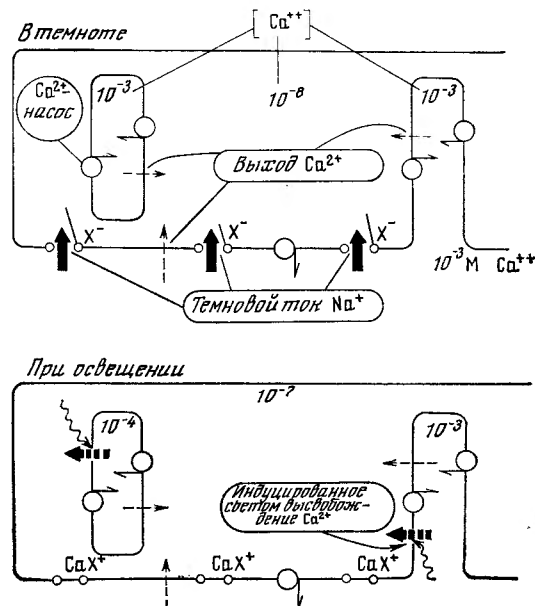


Рис. 1.7а. Модель Хагинса: высвобождение нервного импульса в палочках и колбочках позвоночных. Индуцированное светом изменение конформации родопсина высвобождает ионы кальция из внутримембранного пространства между бислойными клетками; это приводит к закрытию натриевых каналов плазматической мембраны, что вызывает гиперполяризацию. Таким образом, ионы кальция выступают в роли посредника между мембраной диска, где происходит первичная фотореакция, и клеточной мембраной, генерирующей нервный импульс. Справа на схеме изображены колбочки, дисковые мембраны которых представляют собой просто впячивания плазматической мембраны; их функционирование описывается той же моделью с этой небольшой модификацией [3].

торным потенциалом. Как и все изменения мембранного потенциала, появление рецепторного потенциала обуславливают изменения ионной проницаемости мембраны (гл. 5). Считается, что на первой стадии зрительного процесса, т. е. при действии света на родопсин, специфически меняется именно натриевая проницаемость мембраны, причем закрывается ~ 1000 натриевых каналов. Гиперполяризация мембраны наблюдается только

у позвоночных; у беспозвоночных, напротив, происходит деполяризация, т. е. отрицательный заряд внутреннего пространства клетки при освещении уменьшается по абсолютной величине.

Возникает, однако, вопрос: как родопсин может регулировать натриевые каналы плазматических мембран, если он сам расположен в мембранах дисков? Полагают, что между этими двумя мембранными системами в качестве посредников (мессенджеров) функционируют ионы кальция и cGMP. Установлено, что Ca^{2+} -зависимая АТРаза является компонентом мембран дисков. Она действует как кальциевый насос, используя энергию метаболизма для повышения концентрации кальция в простран-

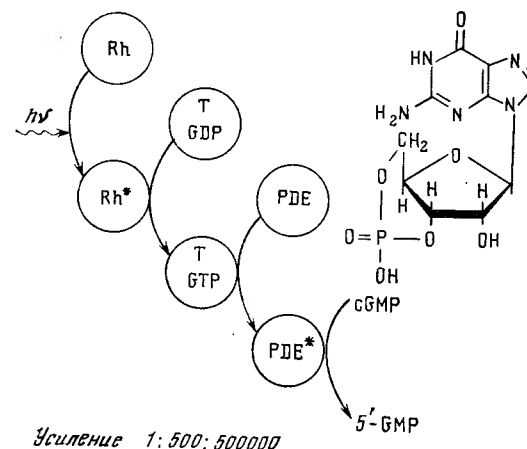


Рис. 1.7б. Альтернативная модель каскада усиления передачи света (по Страйеру). Модель постулирует cGMP в качестве вторичного мессенджера, регулирующего работу натриевых каналов внешней мембраны палочек. Rh — родопсин, Rh* — светоактивированный родопсин, Т — трансдуцин (также называемый G-белком), PDE — фосфодиэстераза, PDE* — фосфодиэстераза, активированная комплексом трансдуцина и GTP.

стве между мембранами дисков. Как постулировано в одной из моделей Хагинса (рис. 1.7а) [3], падающий свет может открывать кальциевые каналы. Остается все же вопрос о роли родопсина при открывании кальциевых каналов в мембранах дисков. Выполняет ли он роль фермента, катализирующего изменения в структурах этих мембран? Или его молекула сама образует канал, который открывается или закрывается в результате конформационных изменений?

Самую важную роль (в качестве мессенджера) может играть здесь циклический нуклеотид cGMP (рис. 1.7б). Установлено, что его концентрация в наружном сегменте палочки высока и что он, по-видимому, поддерживает натриевые каналы мембран

палочек в открытом состоянии. Более того, открыта светозависимая фосфодиэстераза, расщепляющая cGMP. Согласно гипотезе Страйера, этот фермент активируется белком, названным «трансдуцином». В темноте трансдуцин содержит связанный GDP, который обменивается на GTP под действием обесцвеченного родопсина. Именно этот комплекс трансдуцин-GTP и активирует фосфодиэстеразу. Одна молекула обесцвеченного родопсина вызывает обмен GDP на GTP у нескольких молекул трансдуцина, которые посредством комплексообразования активируют равное количество молекул фосфодиэстеразы; последние в свою очередь расщепляют уже многие молекулы cGMP. Таким образом, этот эффектный каскад усиливает обесцвечивающее действие единичного фотона и закрывает на конечной стадии натриевые каналы плазматической мембраны палочек [4].

Недавно Кюн показал, что светоактивированный родопсин (идентичный метародопсину II) непосредственно взаимодействует с трансдуцином, образуя короткоживущий комплекс. Следовательно, запуск ферментативного каскада происходит непосредственно под действием активированного светом родопсина. Более того, внутриклеточная микроинъекция активированного трансдуцина в палочки моделирует действие света, т. е. гиперполяризует клетки. Это свидетельствует о том, что активация каскада ферментов, участвующих в разложении cGMP, играет основную роль в процессах преобразования света. Менее ясно, как взаимосвязаны светозависимые изменения метаболизма cGMP и концентрации Ca^{2+} и что за механизм или вещество регулирует в конечном итоге светозависимую проницаемость клеточной мембраны палочек.

Трансдуцин, также называемый G-белком, удивительно похож на N-белки — описанные в гл. 9 мембранные компоненты, передающие некоторые гормональные сигналы или сигналы нейромедиаторов от их рецепторов к ферменту аденилатциклазе. И трансдуцин, и N-белки состоят из трех полипептидных цепей α , β и γ , и механизмы их действия, по-видимому, очень сходны. Подобие системы родопсин — трансдуцин — фосфодиэстераза и системы β -адренэргический рецептор — N-белок — аденилатциклаза так велико, что возможна, например, перекрестная рекомбинация (замена) отдельных компонентов этих систем. В одном из таких экспериментов по реконструкции было показано, что трансдуцин способен передавать сигналы от β -рецепторов к аденилатциклазе в клетках с недостаточным количеством N-белка.

Родопсин подвергается фотофосфорилированию

Еще одна удивительная ферментная реакция активируется светом: Г. Кюн в 1972 г. открыл функционирующую в присутствии Mg^{2+} cAMP-независимую протсинкиназу, которая специфически фосфорилирует фотообесцвеченный родопсин по остаткам серина и треонина [5]. Сама по себе эта киназа, по-видимому, активна как в темноте, так и на свету; свет, вероятно, вызывает конформационный переход родопсина из формы, которая не может быть фосфорилирована, в конформацию, узнаваемую киназой в качестве субстрата. В каждую молекулу обесцвеченного родопсина может входить 7—9 фосфатных групп. *In vitro* фосфорилирование родопсина протекает медленно, реакция требует нескольких минут, если обесцвечено значительное количество родопсина. При небольших уровнях обесцвечивания эта реакция протекает, однако, значительно быстрее.

Фосфорилирование, возможно, является частью процесса инактивации, который следует за световой активацией родопсина. Другими словами, свет служит для родопсина сигналом «включения» родопсина, а фосфорилирование — сигналом его «выключения», активирующим ферментный каскад [6].

Колбочки и цветовое зрение

Колбочки, являющиеся рецепторами цветового зрения, устроены значительно сложнее, чем палочки, но механизм их действия в принципе такой же. Мы уже упоминали, что колбочки и палочки содержат одинаковый хромофор. Различия в спектрах поглощения (рис. 1.3) обусловлены строением опсинов, с которыми связан ретиналь. О структуре этих белков в колбочках известно еще меньше, чем об опсине палочек. Предполагается, что они закодированы в различных генах и могут, следовательно, иметь различные аминокислотные последовательности. Это подтверждается тем фактом, что цветовая слепота (дальтонизм) имеет рецессивный наследственный характер и связана с полом. Около 1% мужчин не различают красный цвет и 2% — зеленый, тогда как у женщин дальтонизм встречается значительно реже. Все три типа колбочек имеют и морфологические отличия от палочек. Помимо того что колбочки конические по форме, они отличаются от палочек и по структуре своих дисковых мембран, которые у них представляют собой не отдельные органеллы, а просто впячивания плазматической мембраны, т. е. плазматические и дисковые мембраны образуют континуум. Эти отличия колбочек учтены в модели фоторецепции Хагинса (рис. 1.7а, справа): связь между поглощением света и закрыванием натриевых каналов здесь опять-таки осуществляет кальций, который

переносится в цитоплазму из внеклеточной среды через частично стграниченное фоторецепторное пространство дисковых мембран.

Беспозвоночные видят иначе

У беспозвоночных зрительный процесс протекает по-другому. Поглощение света приводит не к гиперполяризации, а, напротив, к деполяризации клетки рецептора, так как внутриклеточное пространство становится менее электроотрицательным по отношению к межклеточному, поскольку ионная проводимость мембраны возрастает. Ионы кальция, вероятно, не участвуют в сопряжении обесцвечивания родопсина с изменением проводимости мембраны. Однако ясной картины биохимии светорецепции у беспозвоночных пока еще не существует.

Третья стадия: интегрирование нервных импульсов

На следующем этапе зрительного процесса потенциал рецептора должен превратиться в нервный импульс, который после многостадийной обработки должен достигнуть в конце концов затылочной доли головного мозга. Как мы увидим в следующих главах, весь процесс высвобождения и передачи нервных импульсов может быть описан в рамках нейробиологии, т. е. на молекулярном уровне. Но на своем пути от родопсина клетка-рецептора к своей мишени (зрительной коре головного мозга) световой сигнал трансформируется от восприятия сетчаткой глаза информации о вспышке света до картины, формирующейся в головном мозге. Исчерпывающее изложение этого процесса дано в книге Кафлера, Николса и Мартина [7], мы же ограничимся здесь его кратким описанием.

Простое детектирование света еще не есть зрение, фоторецептор является «измерителем света», а не фотопластинкой. Зрительная система представляет собой иерархию стадий обработки, на которых простой световой стимулятор дополняется все большим количеством информации. Реакция фоторецептора (палочки или колбочки) прямо пропорциональна количеству падающего света. Но уже в ганглионарных клетках сетчатки едва ли возможно установить пропорциональность между интенсивностью света и ответной реакцией. Эти клетки реагируют преимущественно на световой контраст, а обработка ими сигналов, исходящих от фоторецепторов, называется *интегрированием* и обусловлена двумя особенностями сетчатки. Во-первых, сетчатка имеет трехслойную структуру (рис. 1.8): она состоит из *рецепторных*, *биполярных* и *ганглионарных* клеток, между которыми расположены клетки других типов (*амакриновые*

вые и *горизонтальные*). Во-вторых, она обладает высокой степенью конвергенции: в среднем имеется только одна ганглионарная клетка на 100 рецепторов, т. е. многочисленные световые сигналы, проходя через две промежуточные стадии, сливаются в одной ганглионарной клетке. Неясно, как это происходит без

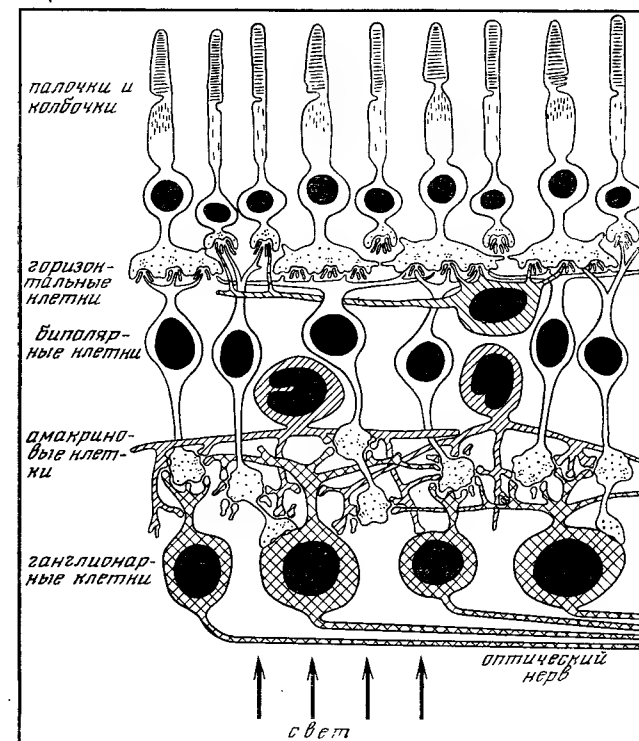


Рис. 1.8. Трехслойное строение сетчатки глаза: палочки и колбочки, биполярные и ганглионарные клетки. Имеется также промежуточная сеть горизонтальных и амакриновых клеток. На этой схеме не отражена конвергенция, на каждые 100 палочек или колбочек имеется только одна ганглионарная клетка. На изображенном здесь уровне происходит уже значительная интеграция и обработка световых импульсов. (Воспроизводится с разрешения Proceedings of the Royal Society [8].)

потери высокой степени разрешения зрительной картины, которая прямо зависит от высокой плотности рецепторов. Когда каждая ганглионарная клетка получает свой сигнал (через промежуточные стадии, описанные выше) от определенной группы рецепторов, в игру вступает специфическая информация, именуемая «контраст». Такая группа рецепторов, называемая *рецеп-*

тивным полем, состоит из центра, освещение которого возбуждает ганглионарную клетку, и концентрического кольца клеток, ингибирующих это возбуждение (рис. 1.9). Имеются также обращенные рецептивные поля, состоящие из ингибирующего центра и возбуждающего кольца. Когда все рецептивное поле освещается рассеянным светом, возбуждение и ингибирование аннулируют друг друга, ганглионарные клетки «ничего не видят», хотя родопсин и обесцвечивается в рецепторах. Видно только малое пятно света в центре рецептивного поля или ореол вокруг центра (а также край или окантовка, которые ограничивают это поле от фона).

От ганглионарных клеток нервные волокна передают импульс через «передаточную станцию» в таламусе, называемую латеральным коленчатым телом, в зрительный центр коры головного мозга (рис. 1.10). Нервные волокна от правой половины зрительного поля обоих глаз идут в левое полушарие головного мозга, а нервные волокна от левой половины — в правое полушарие. Заметьте, что это не нервные волокна левого или правого глаза, но левого и правого секторов каждого глаза,



Рис. 1.9. Диаграмма двух типов рецептивного поля. Группа рецепторных клеток передает свои сигналы ганглионарной клетке: возбуждающие рецепторы окружены кольцом ингибирующих рецепторов (а) и альтернативная конфигурация (б).

которые представлены в контрлатеральной коре головного мозга. Рецептивное поле сетчатки соответствует рецептивному полю коленчатого тела, и контраст здесь усиливается. Обработка информации продолжается в коре головного мозга. Здесь снова используется принцип рецептивных полей, но взаимодействие возбуждающего и ингибирующего импульсов генерирует новый тип специфического контраста: форма и направление на источник света определяют теперь, стимулируется или нет данная корковая клетка. Другие клетки реагируют только на движущиеся источники света и могут различать направление движения. Пионеры этой интересной области исследований, американцы Хьюбел и Визел, классифицируют в зависимости от специфичности информации и сложности соединений с другими клетками «простые», «сложные», «сверхсложные» клетки и «сверхсложные клетки более высокого порядка». Эту иерархию, по-видимому, можно продолжать без конца, но именно в резуль-

тате работы этих клеток из простых фотохимических реакций в сетчатке корой головного мозга формируется изображение. Весь процесс основан на том принципе, что не каждый фотон или рецепторный потенциал приводит к возникновению нервного импульса и прямому возбуждению корковой нервной клетки, а, напротив, многочисленные рецепторные потенциалы интегрируются сначала в сетчатке, затем в таламусе и потом опять в различных слоях коры головного мозга.

Как же исследовать процесс интегрирования? Здесь применяются электрофизиологические методы, в которых тонкие капиллярные электроды, введенные в единичные нервные клетки, регистрируют, какие из этих клеток возбуждаются специфиче-

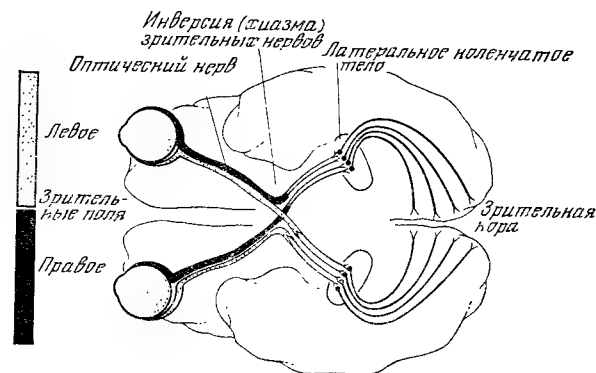


Рис. 1.10. Путь светового импульса от сетчатки до зрительного центра коры головного мозга. (Воспроизводится с разрешения авторов работы [7] и Sinauer Associates Inc.)

ским световым импульсом. В простых случаях сеть нейронов и их связей может быть выявлена и реконструирована, но совершенно очевидно, что это не предмет биохимии!

Нейрохимия как интегральная наука

Теперь, после того как было показано, что нейрохимия не в состоянии выяснить функции высшей нервной деятельности, настало время уяснить, что же реально она может изучить. Детально все это излагается далее в этой книге, здесь же мы ограничимся следующим определением: нейрохимия — это наука о молекулярных основах всех разделов нейробиологии, которая в свою очередь включает нейроанатомию и нейрофизиологию (структурную и функциональную анатомию, метаболизм и электрофизиологию нервной системы), неврологию (науку о нервных заболеваниях), нейрофармакологию, нейротоксиколо-

гию, физиологию поведения (включая психофармакологию), клеточную биологию и биологию развития нервной системы. Биохимия, биофизика, кибернетика и математика необходимы для развития нейробиологии как вспомогательные дисциплины. При этом нейробиология развивается не просто параллельно с другими, смежными науками; она обобщает, интегрирует их, обеспечивая понимание молекулярных основ и механизмов явлений, изучаемых во всех областях нейробиологии (рис. 1.11).

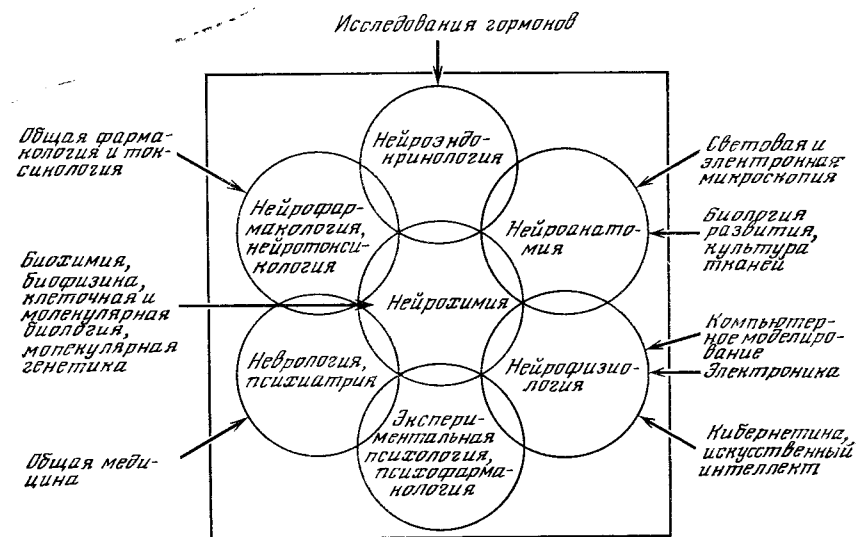


Рис. 1.11. Нейробиология и ее связь с другими разделами нейробиологии и смежными науками. (Предоставлено В. П. Уиттэйкером, Гёттинген.)

В более узком смысле нейробиология — это биохимия нейронов. Поэтому далее мы рассмотрим нервную клетку с ее характерными функциональными элементами.

Нейрон: его функциональные элементы как предмет нейробиологии

Нервная система в сложном организме — это орган коммуникации и интеграции. Нервная клетка, называемая также нейроном, выполняет присущие ей функции благодаря своей полярной структуре (рис. 1.12). Она состоит из собственно тела клетки (*сомы*) и волокнообразных отростков. Полярность нейрона обусловлена тем фактом, что отростки одного типа, *дендриты*, проводят нервный импульс по направлению к телу клетки, тогда как отросток другого типа, *аксон*, проводит его

от сомы. Таким образом, дендриты и аксоны отвечают соответственно за получение и передачу сигнала. Нейрон может иметь множество дендритов, но только один аксон, который, однако, способен ветвиться, образуя *коллатерали*. Нервные волокна несут две функции: они либо проводят импульс от сенсорного рецептора к центральной нервной системе, либо от центральной нервной системы к органу-мишени. Волокна первого типа назы-

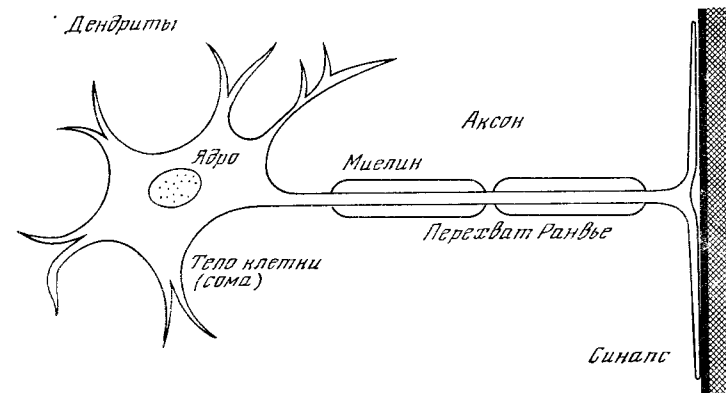


Рис. 1.12. Схема нервной клетки.

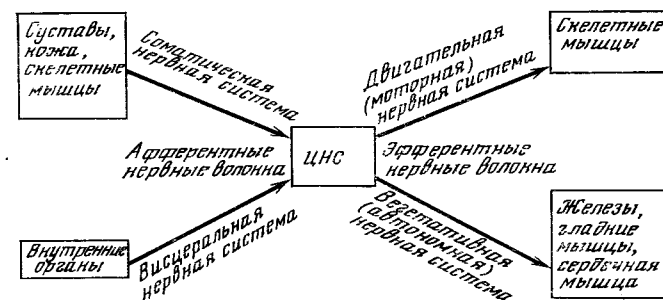


Рис. 1.13. Типичные функции нервных клеток (ЦНС — центральная нервная система). (Воспроизводится с разрешения Р. Ф. Шмидта и Springer-Verlag [9].)

ваются *афферентными* (центростремительными, или чувствительными), а второго типа — *эфферентными* (центробежными, или двигательными). Их типичные функции приведены на рис. 1.13. Для биохимика особый интерес представляют следующие функциональные элементы нейрона.

Плазматическая мембрана. Нейрон, как и всякая другая клетка, заключен в мембрану (рис. 1.14). Ее свойства, однако, более тесно связаны с функционированием нейрона, чем в слу-

чае других клеток, поскольку нервные импульсы передаются в виде изменений электрического мембранного потенциала.

Синапсы — это область функциональных контактов между плазматическими мембранами нейронов. Вещества, влияющие на нервную активность, такие, как эндогенные нейромедиаторы или многочисленные экзогенные лекарственные препараты (например, местные анестетики, нейротоксины), действуют на уровне мембраны. Биологические или патологические изменения в нервной системе часто возникают как следствие изменений нейрональных мембран. Следовательно, в описании основ нейрохимии нужно обязательно включать сведения об образовании и свойствах биологических мембран. В гл. 2 и 3 рассматривается строение молекул веществ, входящих в состав мембран, описываются модели мембран, а также функционирование и

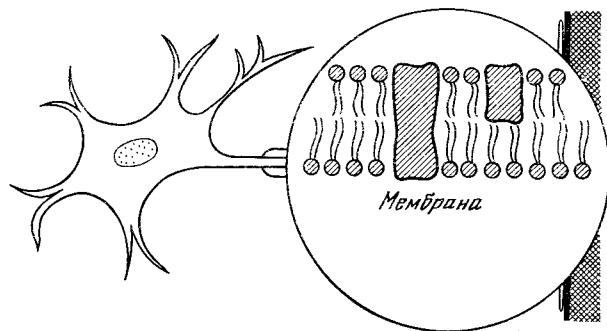


Рис. 1.14. Мембрана нейрона.

метаболизм специфических молекул нейрональных мембран и нарушения их метаболизма, кратко обсуждаются также методы изучения мембран.

Миелин, специализированная мембрана нервного волокна, рассматривается в гл. 4. Большинство нервных волокон, особенно у высших организмов, заключены в многослойные оболочки с тем, чтобы изолировать большую часть их поверхности и ускорить прохождение нервного импульса (рис. 1.15). Возможно, из-за узкой специализации эта мембрана имеет особенно простую структуру, она исследована тщательно и всесторонне. Некоторые заболевания, такие, как множественный склероз, обусловлены дефектами миелиновой оболочки.

Перехват Ранвье. Нервное волокно не полностью покрыто миелиновой оболочкой, она прерывается короткими и регулярно расположенными оголенными участками мембраны — *перехватами Ранвье* (рис. 1.16). Миелинизированные участки мембраны между двумя перехватами называются сегментами нервного

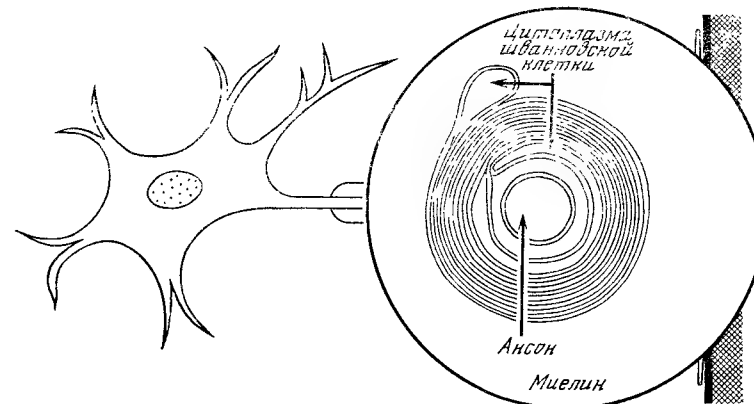


Рис. 1.15. Миелин нейрона.

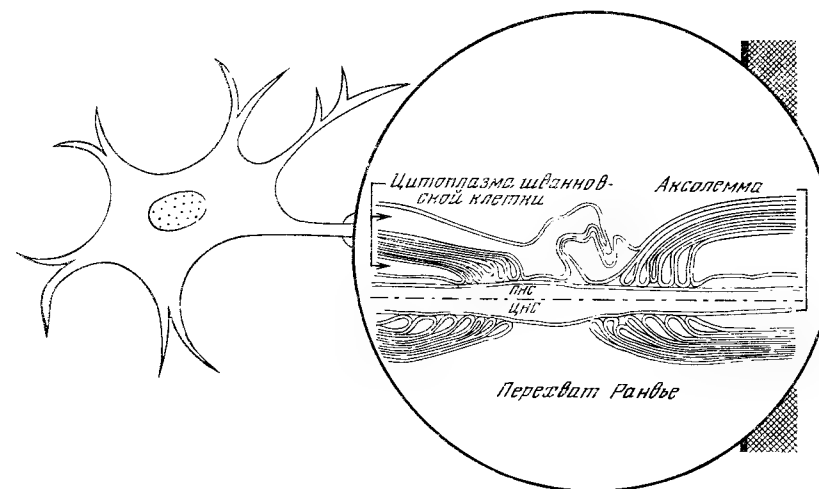


Рис. 1.16. Перехват Ранвье нейрона. ПНС — периферическая нервная система, ЦНС — центральная нервная система.

волокна или *междоузлиями*. Эти участки электрически пассивны в отличие от перехватов, которые участвуют в проведении нервного импульса вдоль волокна. Свойства перехватов, систем ионного транспорта и ионных каналов нейрональных мембран рассмотрены в гл. 6 и 7.

Аксон и дендриты. Функции этих отростков заключаются в передаче информации от одной части нейрона к другой, тогда как сама информация, как мы уже знаем, зависит от электро-

возбуждения нейрональной мембраны. В гл. 5 кратко описаны некоторые сведения об электрофизиологии и кратко упомянуты наиболее важные явления, молекулярные основы которых рассмотрены в гл. 6 и 7. Гл. 6 посвящена структуре и функции ионных каналов аксона, через которые течет пассивный ионный ток во время прохождения нервного импульса. Тонкий ионный баланс между внутри- и межклеточным пространствами должен поддерживаться или восстанавливаться после скоропроходящего ионного тока, сопровождающего нервный импульс. Этот процесс, требующий затрат энергии и называемый **активным транспортом**, осуществляется ионными насосами (рис. 1.17) и рассматривается в гл. 7.

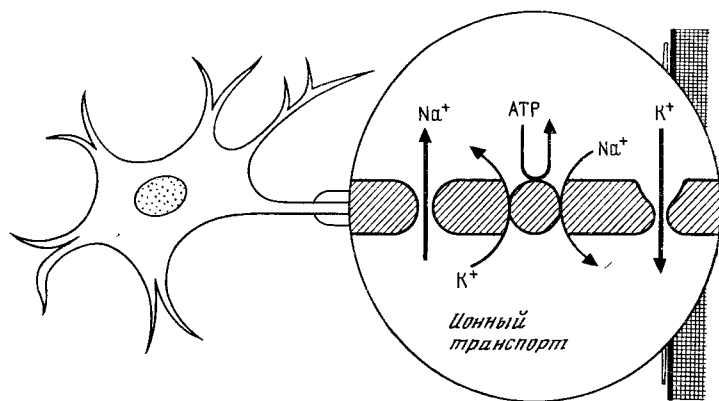


Рис. 1.17. Механизмы ионного транспорта в нейроне.

Синапс. Нервные импульсы должны передаваться от одной клетки к другой. В местах этой передачи находятся специальные контактные области, называемые **синапсами** (рис. 1.18). Аксон может быть связан с сомой второй клетки через **аксо-соматический синапс**. Имеются также **аксо-дендритные** и **аксо-аксонные синапсы**.

Синапс между аксоном и волокном мышцы имеет особую форму, известную как **нейромышечная концевая пластинка**. В нашей центральной нервной системе имеется $\sim 10^{14}$ синаптических связей между более чем 10^{10} нейронов. Синапсы являются регуляторными центрами нервной системы. Их морфология и биохимия очень хорошо приспособлены к выполнению этих функций. В гл. 8 и 9 мы рассмотрим структуру и функцию синапсов, уделив особое внимание их онтогенезу и возможным механизмам синаптической модификации и модуляции, а также тому, как синапсы реагируют на сильные факторы воздействия,

на действие лекарств и на заболевания, такие, как, например, болезнь Паркинсона и *myasthenia gravis*, возникающие в результате нарушения синаптической функции. Возможная роль синапсов в поведенческой адаптации путем тренировки и обучения, наркомания и старение обсуждаются в гл. 9 и 11.

Цитоплазма нейронов иногда имеет >1 м в длину (рис. 1.19). Таким образом, синапс как особенно важный центр нейрональной активности часто оказывается далеко от тела клетки, содержащего ядро — регулятор белкового биосинтеза, необходимого для метаболизма. Поэтому должны существовать цитоплазматическая коммуникация и метаболический обмен между периферическим синапсом и той частью тела клетки (**перикарионом**),

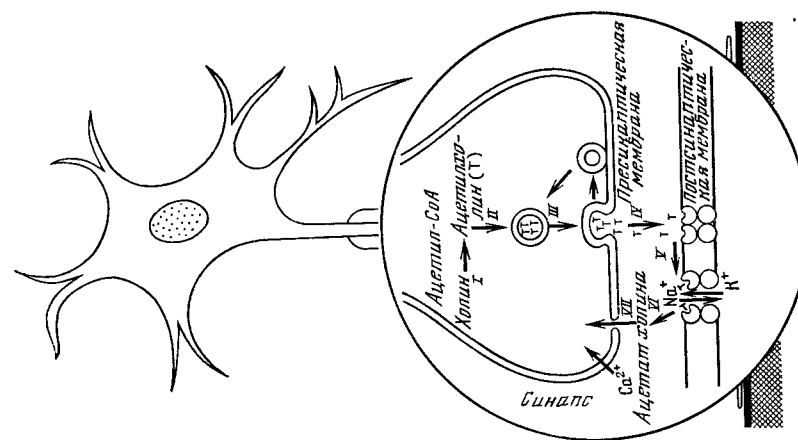


Рис. 1.18. Синапс нейрона.

которая окружает ядро. В гл. 10 описана эта система цитоплазматической коммуникации, называемая **аксоплазматическим транспортом**, а также освещены другие аспекты метаболизма нейронов (энергетические потребности, синтез специфических белков и т. д.).

Глиальные клетки. Рудольф Вирхов в 1846 г. описал вещество, которое он принял за цементирующую основу, объединяющую в одно целое отдельные элементы нервной системы. Он назвал его **нейроглия** (от греческого *glia* — клей), но сегодня известно, что этот «клей» состоит из клеток, которые не являются нервными клетками и сами не проводят нервных импульсов, хотя, очевидно, и выполняют жизненно важные функции в

нервной системе. Эти функции еще не вполне ясны, и мы ограничимся здесь лишь кратким описанием. Глиальные клетки занимают ~50% объема центральной нервной системы человека и составляют >90% всех ее клеток. Они соответствуют *шванновским клеткам* периферической нервной системы и существенно отличаются от нервных клеток тем, что, будучи дифференцированными, сохраняют способность делиться и пролиферировать. Большинство опухолей мозга — это *глиомы*, т. е. они возникают в результате злокачественного роста глиальных клеток. Еще одно различие заключается в том, что глиальные клетки «не возбуждаются», а значит, не генерируют потенциалов действия (гл. 5) и, следовательно, не принимают непосредственного участия в проведении нервных импульсов. Они обладают несколько более высоким мембранным потенциалом, чем

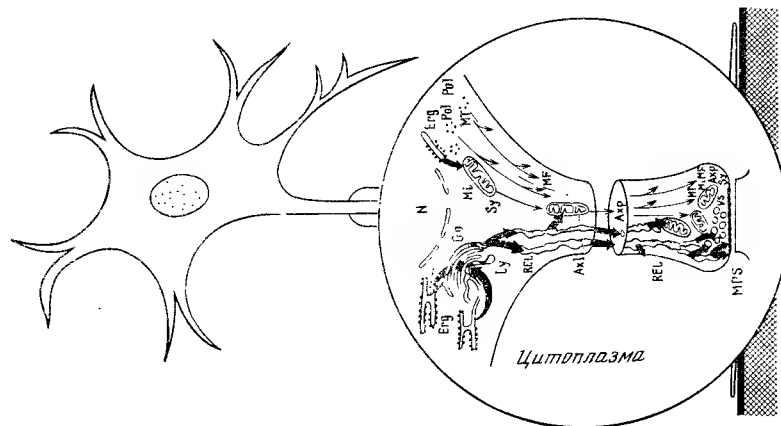


Рис. 1.19. Цитоплазма нейрона (объяснение сокращений см. в подписи к рис. 10.4).

нервные клетки. Потенциал глиальных клеток является чисто калиевым, т. е. его величина определяется разностью концентраций ионов калия во внутри- и внеклеточной среде по уравнению Нернста. В нейронах ионы натрия также вносят вклад в мембранный потенциал (гл. 5 и 6): при возбуждении нервного волокна увеличивается проницаемость мембраны и по Na^+ , и по K^+ , и выход ионов калия одновременно влияет на мембранный потенциал окружающих глиальных клеток. Эти вышедшие ионы калия частично поглощаются глиальными клетками, так что они выполняют роль калиевого буфера, поддерживая постоянной внеклеточную концентрацию этих ионов. В противном случае, т. е. при увеличении межклеточной концентрации ионов калия, порог возбуждения нервного волокна снизился бы (гл. 5) и,

возможно, настолько, что наступила бы его спонтанная активность. Предполагается, что это и происходит при инициации эпилептических судорог.

Глиальные клетки иногда связаны друг с другом контактными зонами, где может происходить метаболический обмен. Напротив, от нервных клеток они всегда отделяются щелью шириной, по крайней мере, 20 нм. Однако есть основания предполагать, что метаболический обмен происходит также между глией и аксонами, причем роль посредника в этом процессе может играть межклеточная концентрация ионов калия [10]. Так, было показано, что в гигантских аксонах кальмара — модельной системе многих нейробиологических исследований — 20—40% глиальных белков с M 20 000—200 000 переносятся в аксон по еще неизвестному механизму [10].

Имеются многочисленные наблюдения (хотя и не складывающиеся пока в полную картину), что глиальные клетки — это не только просто «цемент», т. е. скрепляющая ткань, но эти клетки играют также важную активную роль. Возможно, они контролируют внеклеточное окружение нейрона и непосредственно влияют на интеграцию групп нейронов. Кроме того, они могут снабжать нервную клетку важными веществами, метаболитами и факторами питания. Более подробно роль глиальных клеток, в частности на примере онтогенеза, мы рассмотрим в гл. 11, где увидим, что по крайней мере в клеточной культуре эти «не нервные клетки» ганглии влияют на экспрессию синтеза медиатора. Вот еще один пример. В клеточных культурах линия клеток *нейробластомы* проявляет способность к образованию выростов нейритов (аксонов нервной клетки), но не функциональных синапсов, тогда как линии гибридов *нейробластомы* и *глиомы* образуют синапсы, что является еще одним доказательством важной дополнительной функции глиальных клеток. Периферические глиальные клетки (*шванновские клетки*) участвуют в восстановлении поврежденных нервов. Было даже показано, что после денервации *шванновская клетка* может заменять дегенерированное нервное окончание в мышце и даже выделять медиатор.

Одна из функций глиальных клеток установлена со всей определенностью: *олигодендроглиальные клетки* центральной нервной системы и *шванновские клетки* периферической нервной системы (рис. 1.20) обертываются вокруг аксона и образуют *миелин*, который электроизолирует аксон и ускоряет проведение импульса (гл. 4). Различные отростки одной олигодендроглиальной клетки могут одновременно оборачиваться вокруг нескольких аксонов. Возможно, таким образом они могут осуществлять координацию и интеграцию работы целых групп нейронов. В центральной нервной системе следует морфологически отли-

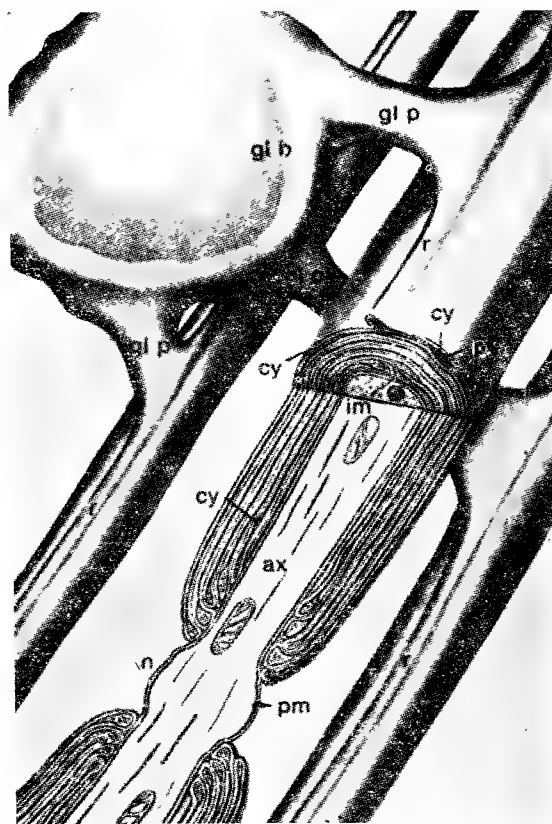


Рис. 1.20. Олигодендроглиальная клетка, отростки которой могут одновременно образовывать миелиновые оболочки нескольких аксонов. glb — тело глиальной клетки, glp — глиальный отросток, ax — аксон, p — перехват, pm — плазматическая мембрана, cy — цитоплазма глиальной клетки, im — внутренний мезаксон, r — край цитоплазмы. (Воспроизводится с разрешения.) [Bunge et al., J. Cell. Biol., 1961, v. 10, p. 67—94].

чать олигодендроглиальные клетки от меньших по размеру сильно разветвленных астроцитов и микроглиальных клеток. Последние работают как макрофаги, а астроциты посредством своих многочисленных отростков контактируют со стенками микрокапилляров и действуют как селективные фильтры, которые пропускают некоторые вещества из крови в межклеточное пространство нейронов и задерживают другие, образуя тем самым селективный гематоэнцефалический барьер.

Модельные системы. Во многих случаях «нервная ткань» является слишком сложным материалом для использования в

биохимических исследованиях нервной системы. Имеется целый ряд более простых препаратов, которые проявляют некоторые основные функции высших систем, некоторые из них описаны в гл. 12. Так, дифференциация нервных клеток исследовалась в клеточной культуре. Имеются также модельные системы для метаболических и фармакологических исследований. В работах по биологии поведения и его молекулярной корреляции используется все возрастающее количество организмов, разведение которых не вызывает затруднений и которые легко получать с генетически детерминированными мутантными характеристиками, например парамеции, нематоды, дрозофилы и мыши. Для изучения биохимии стимуляции и проводимости пригодны такие хемотаксические одноклеточные организмы, как ресничные бактерии и слизевики. При изучении молекулярных основ поведения и его модификации при выработке условного рефлекса и обучении полезными моделями оказались морские моллюски *Aplysia* с их легко идентифицируемыми нейронами (гл. 11). В гл. 12 изложены основы и некоторые примеры применения в молекулярной нейробиологии быстро развивающихся методов рекомбинантных ДНК (генной инженерии).

Выводы

Нейрохимия исследует молекулярные основы нейробиологии. В отличие от молекулярной генетики молекулярная нейробиология может изучать биохимическими методами механизмы передачи информации, но не содержание этой информации. Хорошим примером является здесь зрительный процесс. От возбуждения сетчатки глаза светом до сознательного восприятия картины информация обрабатывается в ходе многочисленных стадий, из которых только первые — поглощение света, высвобождение нервного импульса и его передача — могут быть описаны биохимически. Затем импульс посредством конвергенции и интеграции, т. е. через специфическую электрофизиологическую оптическую систему, подвергается обработке, кодируется и передается в центральную нервную систему. Восприятие и сознание — это особые свойства именно таких специфических функциональных систем. Из всего изложенного ясно, что нейрохимия может описывать только главные стереотипные функции единичной нервной клетки.

Зрительный процесс начинается с поглощения света хромофорами палочек и колбочек сетчатки глаза. Происходящие при этом молекулярные события описываются циклом Вальда — последовательностью реакций обесцвечивания и регенерации родопсина. Родопсин состоит из 11-цис-ретинала, образующего основание Шиффа с опсином — белком с M 41 000. Свет вызывает изомеризацию 11-цис-ретинала до полностью-транс-рети-

наля, диссоциацию комплекса ретиналь — опсин и высвобождение нервного импульса. Для этого высвобождения химический вторичный мессенджер, вероятно Ca^{2+} и/или cGMP, должен пройти путь от мембраны дисков, содержащей родопсин, до плазматической мембраны клетки палочки. Свет стимулирует фосфорилирование родопсина — процесс, который может быть связан с адаптацией сетчатки к изменяющимся световым условиям.

Главный элемент всех нервных систем — нейрон. Проводником нервного импульса является нейрональная мембрана. Прохождение нервного импульса ускоряется специальной мембранной системой — миелиновой оболочкой. Другие структурные элементы нейрона — это афферентные дендриты, эфферентный аксон, сома, которая интегрирует и регулирует метаболизм клетки с помощью своего клеточного ядра, и синапс, осуществляющий коммуникационную связь как между самими нервными клетками, так и между нейронами и их клетками-мишенями иной природы.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. *Ovchinnikov Y. A.*, Rhodopsin and bacteriorhodopsin: Structure-function relationship, *FEBS Lett.*, **148**, 179—191 (1982).
2. *Ostroy S. E.*, Rhodopsin and the visual process, *Biochem. Biophys. Acta*, **463**, 91—125 (1977).
3. *Hagins A. A.*, The visual process: Excitatory mechanism in the primary receptor cells, *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, **1**, 131—158 (1972).
4. *Liebman P. A., Sitaramayya A., Parkes J. H., Buzdygon B.*, Mechanism of cGMP control in retinal rod outer segments, *TIPS*, **5**, 293—296 (1984).
5. *Kühn H., Dreyer W. J.*, Light-dependent phosphorylation of rhodopsin by ATP, *FEBS Lett.*, **20**, 1—6 (1972).
6. *Kühn H.*, Interactions between photoexcited rhodopsin and light-activated enzymes in rods. In: *Progress in Retinal Research*, Osborne N. N., Chader G. J. (eds.), Vol. 3, p. 123—156, Pergamon Press, 1984.
7. *Kuffler S. W., Nicholls J. G., Martin A. R.*, From Neuron to Brain, 2nd edition, Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA, 1984.
8. *Dowling J. E., Boycott B. N.*, Organisation of the primate retina: electron microscopy, *Proc. R. Soc., London, Ser. B*, **166**, 80—111 (1966).
9. *Schmidt R. F.*, Grundriß der Neurophysiologie, 3. Auflage, Springer-Verlag, Berlin — Heidelberg — New York, 1974.
10. *Lasek R. J., Gainer H., Backer J. L.*, Cell-to-cell transfer of glial proteins to the squid giant axon, *J. Cell Biol.*, **74**, 501—523 (1977).

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА

- Kuffler S. W., Nicholls J. G., Martin A. R.*, From Neuron to Brain, 2nd edition, Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA, 1984; *The Brain*, *Sci. Am.*, **241**, the whole issue No. 3, September, 1979.
- Kandel E., Schwartz J.* (eds.), Principles of Neural Science, Arnold, London, 1981.
- Hoppe W., Lohmann W., Markl H., Ziegler H.* (eds.): Biophysics, Springer-Verlag, Berlin — Heidelberg — New York, 1983.
- Shichi H.*, Biochemistry of Vision, Academic Press, New York, 1984.
- См. также работы [1, 6] в разд. «Цитированная литература».

МОЛЕКУЛЫ МЕМБРАН

Нейрохимию не следует определять лишь как химию «нейромолекул»; тем не менее мы вначале рассмотрим основные «строительные блоки» нервной мембраны. В принципе она построена из тех же самых веществ, что и плазматические мембраны клеток других типов, однако содержание этих веществ (относительно сухой массы мембран) значительно отличается (табл. 2.1).

Таблица 2.1. Состав типичных мембран [1]

Состав ^a	Миелин (быка)	Эритроцит	Митохондрия	Бактерия (<i>B. Megaterium</i>)	Хлоропласт (шпината)
Соотношение липид/белок (масс./масс.)	3:1	1:2	1:3	1:3	1:1
Фосфолипиды, %	43	61	90	48	12
Гликолипиды, %	42	11	—	52	80
Стерины, %	17	28	Следы	—	Следы

^a Содержание компонента (в процентах) указано относительно суммарного содержания липидов. Возможное отклонение от 100% обусловлено ошибками анализа.

Предмет нейрохимии шире, чем просто химия «нейромолекул»

Термин «строительный блок» применительно к мембранным молекулам может создать ложное впечатление, что их функции являются исключительно структурными. Из материала двух последующих глав станет ясно, что большая часть этих молекул, если не все, выполняют дополнительные функции. Они могут служить барьерами или воротами, антигенами или рецепторами, ферментами или ионными насосами, функционировать как транслоказы (белки-переносчики для транспорта метаболитов через мембраны) или как специфические центры узнавания. Отдельные молекулы мембран не следует рассматривать изолированно, так как их характерные свойства проявляются при взаимодействии с другими молекулами мембран. В последние

Таблица 2.2. Фосфолипидный состав мембран эритроцитов различных видов животных [1]

Источник эритроцитов	Содержание ^a , %		
	РС	Сфингомиелин	РЕ+РС+РІ
Овца	1	63	36
Бык	7	61	32
Свинья	29	36	35
Человек	39	37	24
Кролик	44	29	27
Крыса	56	26	18

^a РС — фосфатидилхолин, РЕ — фосфатидилэтанолламин, PS — фосфатидилсерин, РІ — фосфатидилинозит.

годы быстрое развитие иммунологии, клеточной биологии и нейробиологии стало возможным именно потому, что клеточные мембраны рассматривались не только как интересные структурные образования, но и как высокоактивные кооперативные системы. Будучи извлеченной из мембраны, отдельная молекула по определению теряет важную часть своих функций, и даже ее структура сохраняется только при ограниченных условиях. Биохимик, который выделяет ионный канал или «пору» нервной мембраны, похож на гурмана, пытающегося добыть дырку от бублика.

Однако тщательный биохимический анализ необходим как предпосылка к пониманию механизмов функционирования нервных мембран. После такого анализа было бы идеально собрать искусственную функционально активную мембранную систему, в которой роль отдельных типов молекул целой системы удавалось бы исследовать при четко определенных условиях. Эксперименты по воссозданию мембран также важны для доказательства механизма их действия, как, например, полный синтез для доказательства строения молекулы витамина.

Липиды, белки и углеводы — строительные блоки мембран нервных клеток

В состав клеточных мембран входят в различных соотношениях липиды, белки и углеводы. Кроме того, важными мембранными компонентами являются ионы металлов и в неменьшей степени вода. Обычно в мембранах преобладают белки (табл. 2.1), но, например, в случае миелиновой оболочки (гл. 4) три четверти массы могут составлять липиды. По химической структуре липиды классифицируют как фосфолипиды, гликолипиды и стерин; данные табл. 2.1 и 2.3 свидетельствуют о значительных

Таблица 2.3. Состав мембран клеток центральной нервной системы быка [2]

Компонент мембраны	Содержание, %			
	Олигодендроглия	Аксон	Миелин	Белое вещество
Липиды (суммарное содержание) ^a	29,5	13,4	75,3	55,0
Холестерин ^b	14,1	20,1	28,1	23,6
Цереброзиды ^b	7,3	12,9	23,2	22,5
Сульфатиды ^b	1,5	7,2	4,1	5,0
Фосфолипиды ^b	62,2	60,0	43,0	46,3
Ганглиозиды ^b	0,75	0,74	0,26	0,54

Фосфолипиды	Содержание, моль/100 моль липидного фосфора			
РС	48	31	24	27
РЕ	24	24	43	32
PS	8	9	14	24
Сфингомиелин	9	16	16	14
Неидентифицированные фосфолипиды	6	12	—	—
Плазмалогены	16	17	35	28

^a Относительно сухой массы биотканей.

^b Относительно суммарного содержания липидов; возможное отклонение от 100% обусловлено ошибками анализа.

различиях мембран по содержанию этих классов липидов. В настоящее время постепенно начинает выясняться, что свойства мембраны существенно зависят от соотношения в ней индивидуальных липидов (гл. 3). Однако делать какие-либо обобщения на этот счет довольно трудно: из табл. 2.2 видно, например, что мембраны эритроцитов, выполняющие в принципе одинаковые функции во всех организмах, обладают тем не менее разным фосфолипидным составом у различных видов. Подобные видовые вариации найдены также в мембранах клеток нервной системы [3]. Поэтому нельзя говорить о какой-то единой «плазматической мембране», «мембране аксонов» или «миелиновой мембране».

Прежде чем мы рассмотрим структуру мембран более подробно (гл. 3), остановимся на структуре липидов — компонентов, общих для всех мембран. Мы только кратко коснемся их метаболизма, но зато более детально обсудим структуру и возможную функцию класса липидов, наиболее важного для мембран нервных клеток, а именно ганглиозидов. Затем после обзора молекулярных механизмов патологических нарушений липид-

ного метаболизма обсудим углеводсодержащие *гликопротеины*, а в последующих главах — специфические белки мембран нервной системы.

Принципы структурной организации фосфолипидов обуславливают большое разнообразие их молекулярных структур

Общий структурный фрагмент всех *фосфолипидов* — моноэфир фосфорной кислоты глицеро-3-фосфат (рис. 2.1), образующийся в результате восстановления продукта гликолиза дигидроксиацетонфосфата внутриклеточным ферментом NAD-зависимой глицеро-3-фосфатдегидрогеназой (рис. 2.2).

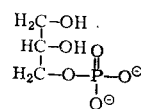


Рис. 2.1. Глицеро-3-фосфат.

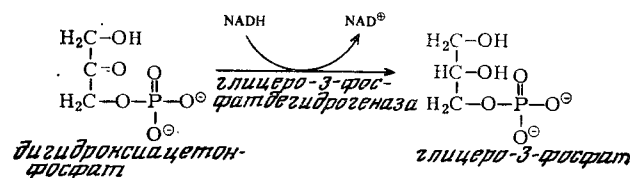


Рис. 2.2. Образование глицеро-3-фосфата из дигидроксиацетонфосфата.

Глицеро-3-фосфат может образоваться также путем фосфорилирования глицерина, катализируемого Mg-АТФ-зависимой киназой. Затем глицеро-3-фосфат ацилируется в две стадии соответствующими производными ацилкофермента А — вначале до лизофосфатидовой и затем до фосфатидовой кислоты (рис. 2.3).

Важными «строительными» блоками мембран служат следующие производные фосфатидовой кислоты: фосфатидилхолин (лецитин, сокращенно РС от *англ.* phosphatidylcholine), фосфатидилэтаноламин (РЕ), фосфатидилсерин (РС), фосфатидилинозит (РІ) и плазмалоген (рис. 2.4).

Каждая формула на рис. 2.4 соответствует целой серии фосфолипидов, поскольку углеводородная цепь ацильной группы может быть насыщенной или ненасыщенной и иметь различную длину (чаще встречаются радикалы из 15 или 17 атомов углерода). В случае фосфатидилинозита одна или более гидроксильных групп остатка инозита могут быть этерифицированы

фосфорной кислотой. Все это приводит к большому разнообразию строительных блоков мембран. Пока нет ясных представлений о биологическом значении такого разнообразия. Структура ацильной группы влияет на свойства мембраны (см. гл. 3), а мембраны разных частей одного организма различаются по составу. Связь между структурой фосфолипидов и биологической функцией мембраны, по-видимому, не может вызывать сомнений.

Синтез фосфатидилглицерина начинается с активации фосфатидовой кислоты цитидинтрифосфатом (СТР). Возникающая СМР-фосфатидовая кислота реагирует с инозитом или с аминокислотой серином, образуя соответственно *фосфатидилинозит* или *фосфатидилсерин*.

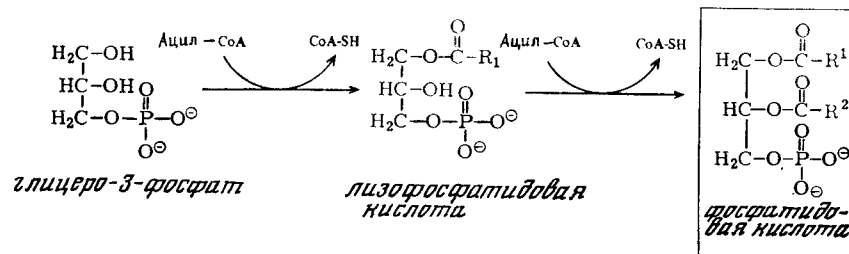


Рис. 2.3. Синтез фосфатидовой кислоты.

Декарбоксилирование фосфатидилсерина ферментом, содержащим в качестве кофермента пиридоксальфосфат (PLP), приводит к образованию *фосфатидилэтанолamina*, который далее метилируется до *фосфатидилхолина* посредством переноса метильных групп от S-аденозилметионина. С другой стороны, РС, РЕ могут также образовываться из диацилглицерина и активированных цитидинфосфатов: CDP-серина, CDP-этанолamina и CDP-холина (рис. 2.5).

Метилирование фосфолипидов. Представляется вероятным, что метилирование РЕ связано с передачей сигнала через клеточные мембраны: метилтрансфераза, расположенная на внутренней стороне многих клеточных мембран, метилирует до фосфатидил-N-монометилэтанолamina. Вторая метилтрансфераза, локализованная на внешней стороне мембраны, осуществляет его дальнейшее метилирование до РС. При этом донором метильных групп в каждом случае также является S-аденозилметионин. Метилирование РЕ влияет на текучесть мембраны, оно стимулируется нейромедиаторами ряда катехоламина, например адреналином, и приводит к поступлению в клетку ионов кальция, образованию сАМР, высвобождению гистамина и т. д. [4].

$$\begin{array}{c}
 \text{H}_2\text{C}-\text{O}-\overset{\overset{\text{O}}{\parallel}}{\text{C}}-\text{R}^1 \\
 | \\
 \text{HC}-\text{O}-\overset{\overset{\text{O}}{\parallel}}{\text{C}}-\text{R}^2 \\
 | \\
 \text{H}_2\text{C}-\text{O}-\overset{\overset{\text{O}}{\parallel}}{\underset{\underset{\text{O}^-}{\parallel}}{\text{P}}}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\overset{\overset{\text{CH}_3}{\mid}}{\underset{\underset{\text{CH}_3}{\mid}}{\text{N}^+}}-\text{CH}_3
 \end{array}$$

фосфатидилхолин (PC)
(лецитин)

$$\begin{array}{c}
 \text{H}_2\text{C}-\text{O}-\overset{\overset{\text{O}}{\parallel}}{\text{C}}-\text{R}^1 \\
 | \\
 \text{HC}-\text{O}-\overset{\overset{\text{O}}{\parallel}}{\text{C}}-\text{R}^2 \\
 | \\
 \text{H}_2\text{C}-\text{O}-\overset{\overset{\text{O}}{\parallel}}{\underset{\underset{\text{O}^-}{\parallel}}{\text{P}}}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2
 \end{array}$$

фосфатидилсерин (PS)

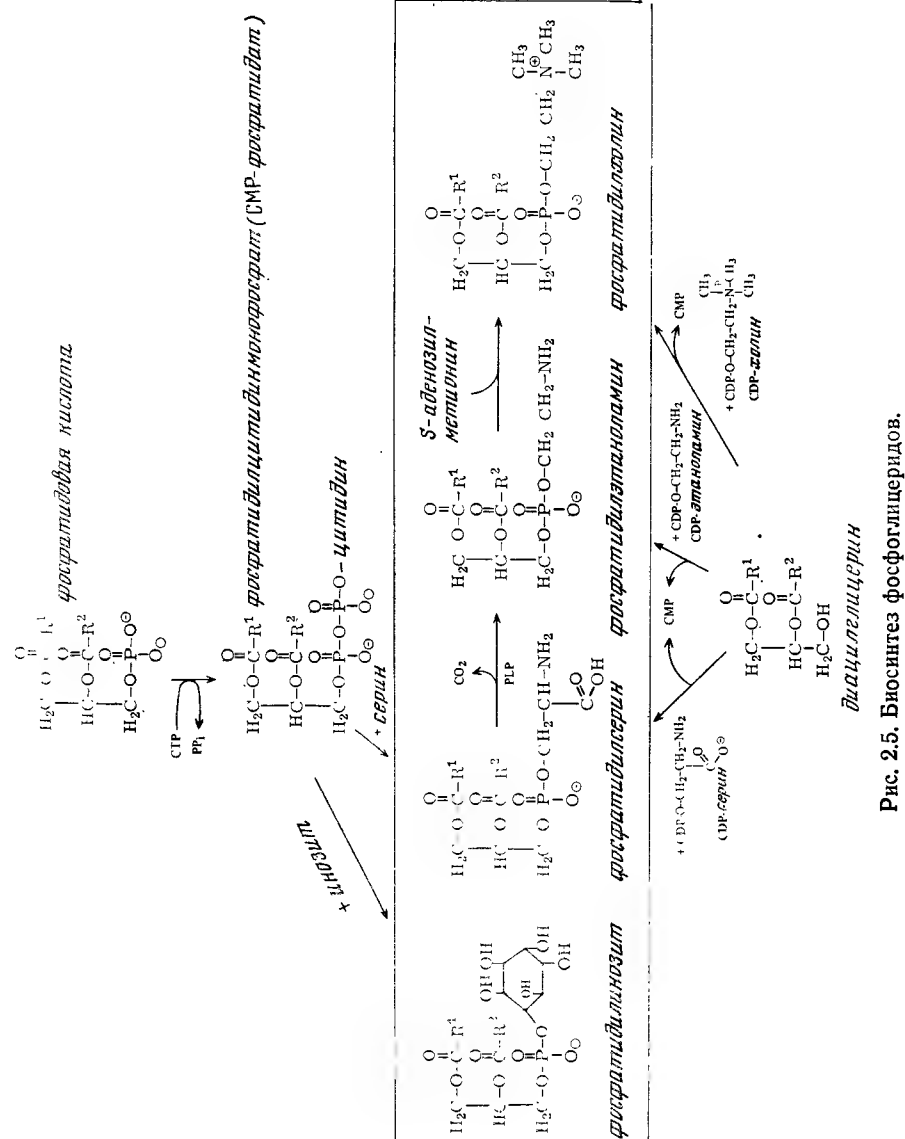
$$\begin{array}{c}
 \text{H}_2\text{C}-\text{O}-\overset{\overset{\text{O}}{\parallel}}{\text{C}}-\text{R}^1 \\
 | \\
 \text{HC}-\text{O}-\overset{\overset{\text{O}}{\parallel}}{\text{C}}-\text{R}^2 \\
 | \\
 \text{H}_2\text{C}-\text{O}-\overset{\overset{\text{O}}{\parallel}}{\underset{\underset{\text{O}^-}{\parallel}}{\text{P}}}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2
 \end{array}$$

фосфатидилинозит (PI)

$$\begin{array}{c}
 \text{H}_2\text{C}-\text{O}-\overset{\overset{\text{O}}{\parallel}}{\text{C}}-\text{R}^1 \\
 | \\
 \text{HC}-\text{O}-\overset{\overset{\text{O}}{\parallel}}{\text{C}}-\text{R}^2 \\
 | \\
 \text{H}_2\text{C}-\text{O}-\overset{\overset{\text{O}}{\parallel}}{\underset{\underset{\text{O}^-}{\parallel}}{\text{P}}}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2
 \end{array}$$

фосфатидилэтанолмин (PE)

Фосфатидилинозит. Это соединение особенно интересно для нейрохимиков. Гидроксильные группы инозита могут быть этерифицированы одной или большим количеством фосфатных групп. Для молекулы липида, который используется в качестве строительного блока мембраны, это означает увеличение отрицательного заряда, который может повлиять на физические свойства мембраны. Кроме того, способность связывать двухзарядные ионы (Ca^{2+} , Mg^{2+}) возрастает с увеличением числа



фосфатных групп. Наблюдалась взаимосвязь увеличения числа фосфатных групп с активностью нервной системы [4–6].

Еще в 1953 г. Хокин и Хокин отмечали, что нейромедиатор ацетилхолин (гл. 8) стимулирует включение ^{32}P в фосфолипиды поджелудочной железы. С тех пор подобные эффекты отмечались для ряда клеток в ответ на самые разные внешние сигна-

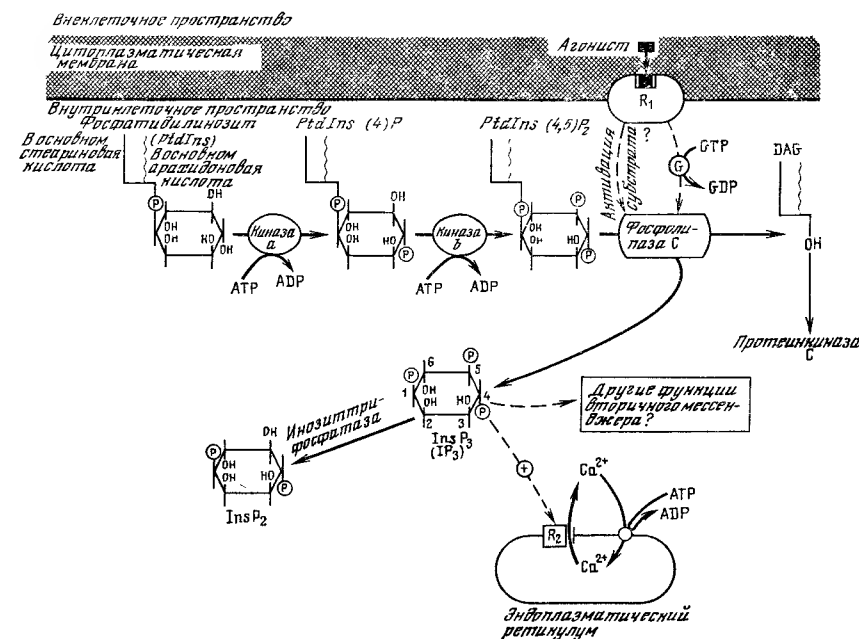


Рис. 2.6. Роль фосфатидилинозита при передаче сигнала через клеточную мембрану. Агонист (сигнал) связывается с рецептором R_1 на внешней поверхности клеток. Комплекс агонист-рецептор активирует (связываясь с сопрягающим G- или N-белком или непосредственно) фосфолипазу C, которая отщепляет инозиттрифосфат (InsP_3 , IP_3) от фосфатидилинозит-4,5-дифосфата. Затем IP_3 включает выброс ионов кальция из эндоплазматического ретикула (рецептор R_2). Другим продуктом расщепления под действием фосфолипазы C является диацилглицерин (DAG), который представляет собой еще один вторичный мессенджер, активирующий протеинкиназу C. Стадии фосфорилирования, ведущие к InsP_3 , обозначены как (a) и (b). Схема взята из работы [6] и приведена с некоторыми изменениями.

лы. Мичел предположил, что фосфорилирование фосфатидилинозита происходит в тех случаях, когда агонисты влияют на внутриклеточную концентрацию ионов кальция [5]. Выясняется, по-видимому, следующая картина [6]: определенные внешние стимулы через поверхностные рецепторы клетки вызывают мобилизацию Ca^{2+} из внутриклеточных пулов. Вторичным мес-

сенджером, включающим эту мобилизацию, является инозиттрифосфат (инозит-1,4,5-трифосфат, IP_3). Он образуется при действии Ca^{2+} -зависимой фосфолипазы C, активируемой в мембране агонист-стимулированными рецепторами, такими, как, например, мускариновые холинэргические, α_1 -адренэргические, серотонинэргические и пептидэргические (рецепторы вещества P, вазопрессина, ангиотензина, брадикинина). В большинстве случаев, если не во всех, в процессе может участвовать также находящийся в мембране сопрягающий G- или N-белок (гл. 9) [7]. Другим продуктом расщепления фосфатидилинозитдифосфата фосфолипазой C является диацилглицерин (DAG) — второй важный посредник, активирующий протеинкиназу C [8] (гл. 9). Эта гипотеза, суммированная Берриджем и Ирвином, как показано на рис. 2.6, не вполне завершена, но она

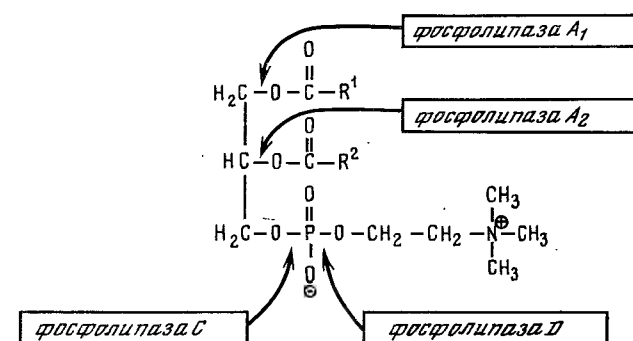


Рис. 2.7. Специфичность фосфолипаз.

удовлетворительно объясняет многие новые факты в этой важной и быстро развивающейся области исследований и поэтому изложена здесь.

Фосфолипазы инициируют деградацию фосфолипидов

Деградация фосфатидилглицеринов начинается с отщепления ацильных групп, которое катализируется липазами, различающимися по специфичности к отщепляемой группе. Фосфолипаза A_2 , например, гидролизует эфирную связь при среднем атоме углерода глицерина с образованием лизолецитина; фосфолипаза A_1 отщепляет другой ацильный остаток, а дальнейший гидролиз осуществляют фосфолипазы C и D (рис. 2.7). Деградация образующихся жирных кислот происходит посредством β -окисления [9].

Особого внимания заслуживает ненасыщенная жирная кислота, называемая *арахидоновой*. Она высвобождается фосфолипазой A_2 и выступает как в роли предшественника простагландинов, тромбоксанов и лейкотриенов, так и в роли важного клеточного регулятора (или сама по себе, или после окисления липоксидазой). Было показано, например, что арахидоновая кислота стимулирует гуанилатциклазу: обусловленное нейромедиатором образование cGMP (гл. 9), видимо, регулируется высвобождением арахидоновой кислоты, опосредованным рецептором. С другой стороны, образование cAMP в ряде тканей регулируется, вероятно, некоторыми простагландинами.

Лизолецитин, продукт действия фосфолипазы A_2 на лецитин (фосфатидилхолин), может рециклироваться с образованием такого же самого или другого лецитина (рис. 2.8).

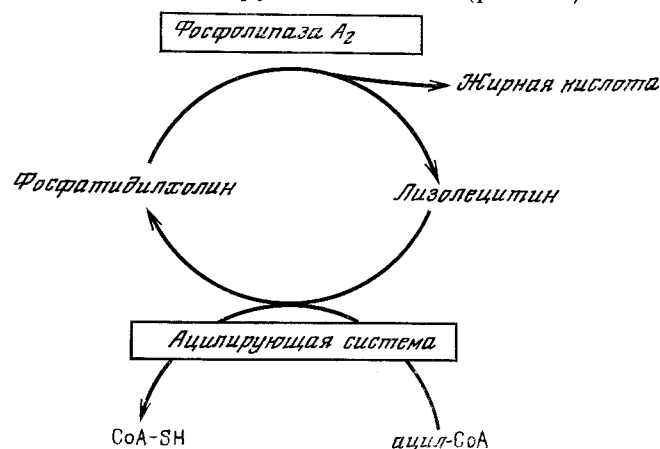


Рис. 2.8. Цикл деацилирования — рециклирования фосфолипидов.

Поскольку этот цикл осуществляется с большой скоростью, весьма вероятно, что его роль состоит в поддержании концентрации специфических липидов. Важно предотвратить генерацию слишком высокой концентрации лизолецитина, которая может привести к лизису мембран.

Холестерин является особенно важным компонентом липидных мембран, поскольку он влияет на их текучесть. Сложный биосинтез холестерина кратко представлен на рис. 2.9; в учебниках биохимии этот вопрос обычно обсуждается более подробно [9].

Все 27 С-атомов холестерина биогенетически происходят из ацетилкофермента А; биосинтез протекает через изопрен или его активированные формы, причем шесть изопреновых единиц объединяются в сквален, который и циклизуется до холестерина.

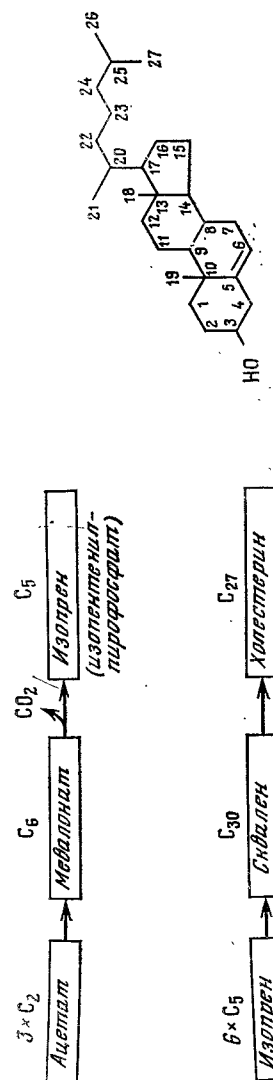


Рис. 2.9. Биосинтез холестерина.

Сфинголипиды не только присутствуют в нервных клетках, но и играют в них исключительно важную роль

Сфинголипиды, в особенности углеводные производные — ганглиозиды и цереброзиды, вызывают огромный интерес исследователей вследствие их особой роли в процессах коммуникации нервной клетки с окружающей ее средой [10].

Имеются многочисленные доказательства того, что основной функцией сфинголипидов является их участие в передаче сигналов с наружной поверхности клетки в ее внутреннее пространство. Структура этих молекул и их локализация отвечают этой функции: сфинголипиды состоят из липофильной (*церамид*) и гидрофильной (*углеводной*) частей (рис. 2.12). Это позволяет им с помощью церамида прочно закрепляться в липидной фазе клеточной мембраны и вместе с тем взаимодействовать с окружающей полярной средой. Молекулы сфинголипидов ориентированы исключительно наружу, и со стороны цитоплазмы мембрана, по-видимому, не содержит их углеводных остатков. Разнообразие углеводных частей сфинголипидов делает эти липиды носителями специфичности и информации.

Ганглиозиды содержат остатки N-ацетилнейраминаовой кислоты, которые благодаря своему отрицательному заряду обладают свойством связывать ионы и другие лиганды. Поэтому для ганглиозидов предполагаются следующие функции:

1) они являются рецепторами внешних сигналов (далее в этой главе приводится пример бактериальных нейротоксинов);

2) вместе с гликопротеинами они отвечают за специфичность клеточной

поверхности, распознавание клеток и их адгезию; именно об этом свидетельствует изменение ганглиозидного состава клеток, трансформированных вирусами;

3) они могут играть важную роль в развитии нервной системы при образовании «правильных» межклеточных связей. Наличие этой функции доказывает временное увеличение содержания ганглиозидов в центральной нервной системе перед началом миелинизации. Таким образом, ганглиозиды могут участвовать в коммуникации между мембранами аксонов и окружающими их олигодендроглиальными клетками;

4) аналогичным путем они могут принимать участие в функциональной адаптации зрелой нервной системы. В таких явлениях, как приспособляемость и обучаемость (гл. 11), могут участвовать повышенные концентрации определенных гликолипидов и гликопротеинов в синапсах [11].

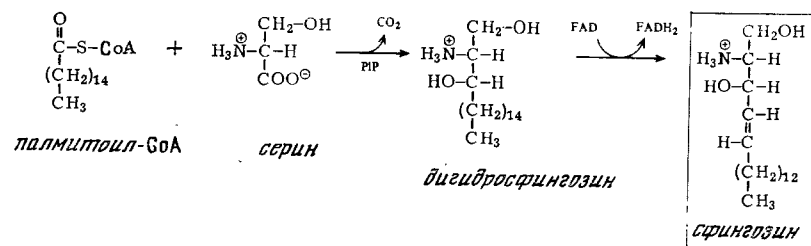


Рис. 2.10. Синтез сфингозина — предшественника сфинголипидов.

Сфинголипиды — это производные аминспирта сфингозина, который в свою очередь образуется из пальмитоилкофермента А и аминокислоты серина в несколько стадий (рис. 2.10).

Аминогруппа сфингозина, очевидно, реагирует с ацилкоферментом А, образуя амидную связь, а концевая гидроксильная группа при реакции с холином образует фосфорилхолиновый эфир. N-Ацилсфингозин — сфингомиелин. N-Ацилсфингозин (церамид) является продуктом первой стадии и исходным веществом для дальнейших реакций, приводящих к образованию цереброзидов и ганглиозидов (рис. 2.11).

Цереброзиды. В центральной нервной системе производные галактозы превалируют среди цереброзидов и их сульфозэфиров сульфатидов. В белом веществе мозга галактоцерамид присутствует в более высоких концентрациях, чем в сером веществе; он также является характерным компонентом миелина. В перикарионах нейронов найдены только малые количества галактоцереброзида, но значительные его концентрации содержатся

в мембране аксона. Что кроется за таким сходством миелиновой и аксональной мембран, еще предстоит изучить. Поскольку глюкоцерамид был найден как в астроцитах, так и в нейронах, то первоначальное предположение о том, что этот гликолипид специфичен только для нейронов, а галактоцерамид — только для олигодендроглиальных клеток и, следовательно, миелина, очевидно, неверно.

Ганглиозиды. Если в цереброзидах концевая гидроксильная группа церамида образует связь только с моносахаридным остатком (глюкозы или галактозы), то в ганглиозидах она связана с олигосахаридом. В отличие от цереброзидов ганглиозиды обнаруживаются преимущественно в сером веществе мозга и в клетках нейронов; их концентрация в белом веществе составляет

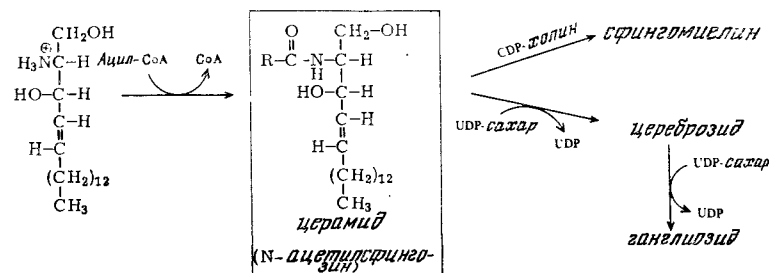


Рис. 2.11. Церамид — исходное вещество при биосинтезе ганглиозидов, цереброзидов и сфингомиелина.

всего 10% содержания в сером веществе. Вариабельность олигосахаридной части теоретически допускает существование очень большого количества различных ганглиозидов, но до сих пор их найдено только 12. Четыре основных ганглиозидов — это G_{M1}, G_{D1a}, G_{D1b}, и G_{T1}. Согласно номенклатуре Свеннерхольма, внесшего наиболее значительный вклад в характеристику этих соединений [12], буквой G обозначают ганглиозид, M — его моносиало (т. е. с одним остатком N-ацетилнейраминавой кислоты), D — дисиало, T — трисиало и т. д. производные; цифра 1 в индексе указывает на полную углеводную структуру с концевой галактозой, 2 — на первый, т. е. не содержащий концевой остатка галактозы, продукт деградации и т. д. (рис. 2.12 и 2.13). Ганглиозиды присутствуют почти во всех тканях, но богаче всех ими нервная ткань, а особенно фракция синапсом этой ткани.

Ганглиозиды в нервной системе млекопитающих повсюду, но их распределение по классам различно в разных тканях: так, зрительная кора относительно богата G_{T1} и G_{D1b}, в коре

головного мозга содержится в основном G_{T1} , в белом веществе — G_{M1} , а у человека также сialogалактоцерамид. В периферической нервной системе находят те же четыре ганглиозида, за исключением того, что в G_{M1} остаток N-ацетилгалактозамина заменен на остаток N-ацетилглюкозамина.

Метаболизм ганглиозидов. Биосинтез ганглиозидов из церамида происходит постадийно путем последовательного прибавле-

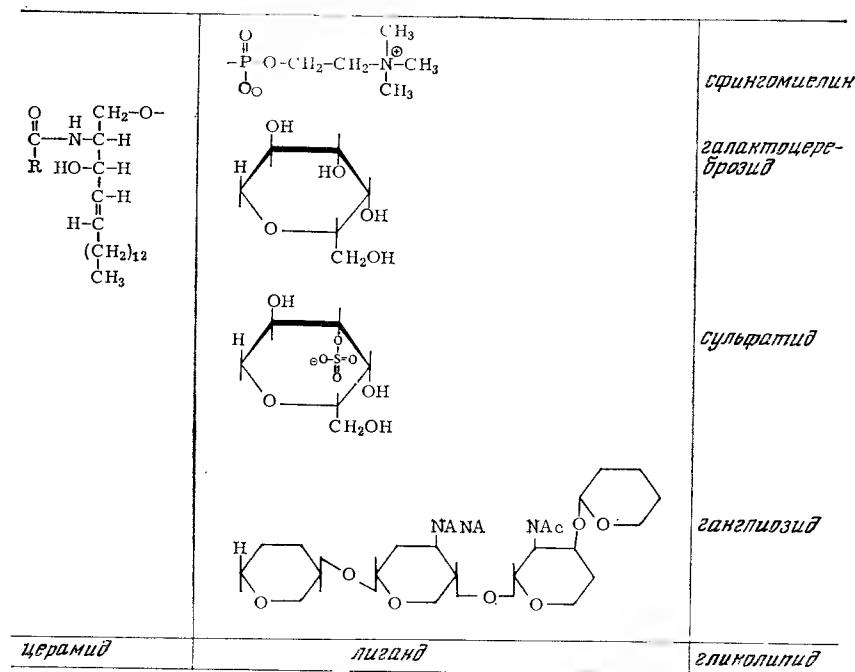


Рис. 2.12. Четыре класса сфинголипидов: сфингозин или его N-ацильное производное церамид лежат в основе четырех классов сфинголипидов; приведены представители каждого из этих классов. Все они состоят из гидрофобного церамида и гидрофильных заместителей.

ния остатков моносахаридов (рис. 2.14). Моносахариды вначале активируются, образуя уридиндифосфатные (UDP) эфиры (UDP-глюкозу и т. д.). Перенос сахарных остатков катализируется несколькими гликозилтрансферазами, каждая из которых специфична для одной из стадий, показанных на рис. 2.14. Эти гликозилтрансферазы являются мембранно-связанными ферментами, причем особенно активны такие ферменты в мембранах синапсом. Предполагают, что это является еще одним доказа-

тельством участия ганглиозидов в синаптической передаче. Гликозилтрансферазы существуют, вероятно, в форме полиферментных комплексов, и это, видимо, один из тех редких примеров в природе, когда специфическая последовательность олигомерной молекулы синтезируется из ряда строительных блоков (в отличие от синтеза белков) без участия матрицы. Таким образом, здесь, как и в случае некоторых пептидных антибиотиков,

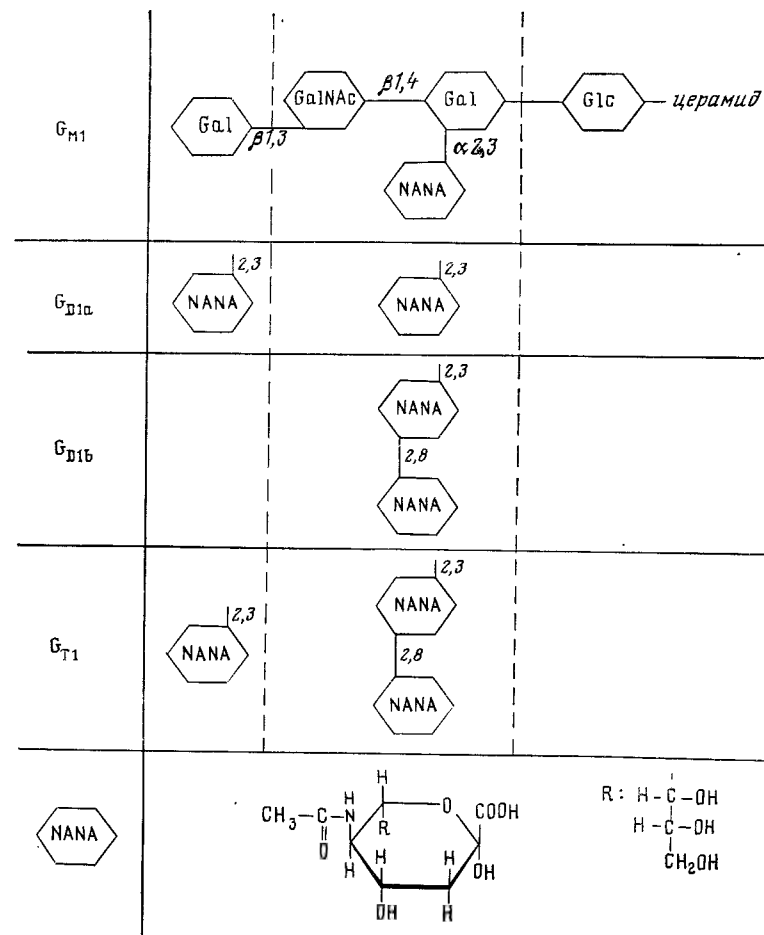


Рис. 2.13. Схема, разъясняющая номенклатуру ганглиозидов. Наиболее важные ганглиозиды различаются по числу остатков N-ацетилнейраминовой (сиаловой) кислоты (NANA): имеются моно-(M), ди-(D), три-(T) сialogанглиозиды. Когда концевой остаток NANA ганглиозида G_{D1a} гидролизуется нейраминидазой, образуется G_{M1} , который превращается в G_{M2} при гидролизе концевой остатка галактозы.

продукт кодируется не первичной структурой нуклеиновой кислоты, а последовательностью ферментов.

Дегградация ганглиозидов также протекает постадийно при действии специфических гликозидаз и нейроаминидазы. Нарушения в функционировании этих гидролаз вызывают ряд серьезных заболеваний хранения липидов, липидозов (см. ниже). Обсуждаемые гликозидазы и нейроаминидазы — лизосомные

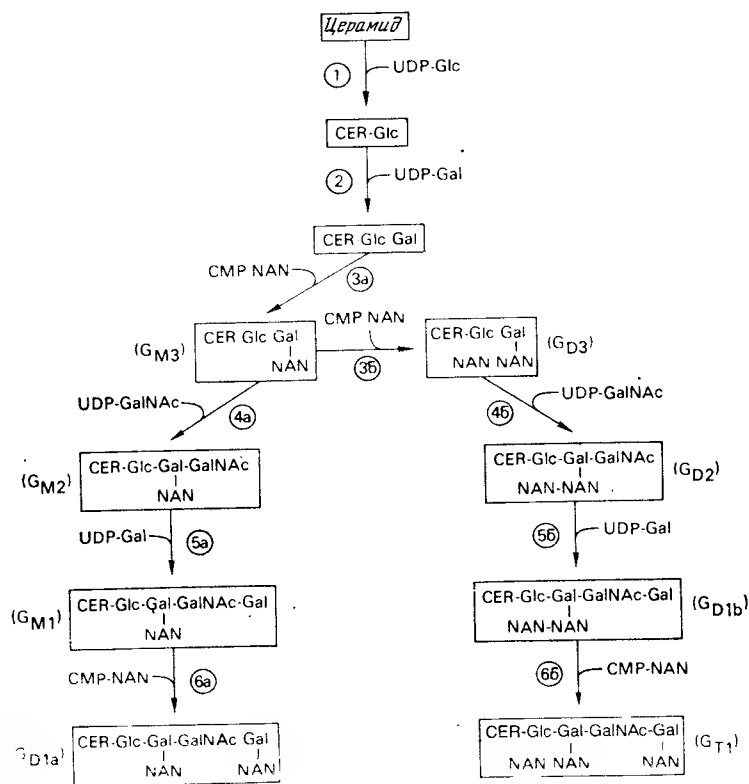


Рис. 2.14. Биосинтез ганглиозидов [10].

ферменты; так, мембранно-связанная нейроаминидаза млекопитающих — это белок, который отщепляет от молекулы ганглиозидов концевой остаток N-ацетилнейраминной кислоты.

Соображения о возможных функциях сфинголипидов

Если проследить синтез различных сфинголипидов в процессе развития центральной нервной системы, то легко различить три группы этих соединений: количества галактоцерамидов и

галактосульфатидов значительно возрастают по мере миелинизации, тогда как синтез ганглиозидов, по-видимому, связан с дифференциацией нейронов. Количества сфинголипидов третьей группы — глюкоцерамида и лактоцерамида — остаются в процессе развития относительно постоянными. Эти наблюдения подтверждаются и результатами исследования различных типов дифференцированных клеток. Активность ферментов, участвующих в синтезе сфинголипидов, также меняется в соответствии с изменением концентрации этих липидов.

Пока нет еще четкой концепции о роли сфинголипидов, но имеется ряд наблюдений и высказано несколько интересных догадок [13]. Как уже отмечалось, сфинголипиды связаны с адгезией клеток, их распознаванием, иммунологической специфичностью*, синаптической передачей и рецепторными свойствами клеточных поверхностей. Ниже мы обсудим некоторые данные, которые могут быть использованы при создании модели функционирования ганглиозидов.

Ганглиозиды — рецепторы бактериальных токсинов

Токсин столбняка. Рецепторные свойства ганглиозидов к бактериальным токсинам хорошо известны [14]. Токсин столбняка, вырабатываемый *Clostridium tetani*, представляет собой белок с $M 160\,000$. Восстановление сульфгидрильными реагентами расщепляет его на два полипептида: А ($M 55\,000$) и В ($M 105\,000$), которые, видимо, биосинтезируются из общей полипептидной цепи путем протеолиза. Ван Хейнинген показал, что этот токсин связывается специфично с ганглиозидами GD_{1a} и GT_1 , которые, по его мнению, являются природными рецепторами этого нейротоксина [15]. Комплекс токсина и ганглиозида становится нетоксичным, тогда как инкубация ганглиозидов с нейроаминидазой приводит к продуктам, которые более не связываются с токсином. Связывающий участок для ганглиозида найден на В-цепи токсина, а сами по себе полипептиды А и В нетоксичны.

Токсин ботулизма. Имеются доказательства, что механизм нейротоксического действия токсинов столбняка и ботулизма сходны. Ботулинический токсин — это экзотоксин *Clostridium botulinum*, способный превращать неправильно законсервированное мясо в смертельно ядовитый продукт.

* Иммунологически сфинголипиды являются *гаптенами*, а не *антигенами*, т. е. индивидуальные молекулы ганглиозидов вызывают только слабое образование антител, а молекулы цереброзидов и вовсе его не вызывают. Однако они могут связываться с заранее выработанными на них антителами.

Различные бактериальные штаммы продуцируют серологически различные токсины, но все они построены одинаковым образом [16] и образуются из неактивного предшественника (претоксина — белка с $M \sim 145\,000$) посредством протеолитического расщепления одной из пептидных связей. Получающиеся субъединичные пептиды с $M\,50\,000$ и $\sim 100\,000$ связаны дисульфидной связью, восстановительное расщепление которой приводит к потере токсичности [17]. Токсин ботулизма связывается специфично с ганглиозидами, но не с цереброзидами или другими липидами. Прочность связывания возрастает с увеличением числа остатков сиаловых кислот в ганглиозиде (т. е. от G_{M1} к G_{T1}). Возможно, что токсин может также реагировать с гликопротеинами. Токсин ботулизма *in vitro* селективно связывается с синапсоматомами, а *in vivo* он блокирует химические синапсы посредством ингибирования пресинаптического высвобождения молекулы медиатора.

Токсин холеры. Бактерии *Vibrio cholerae* продуцируют белок, который не является нейротоксином, но тем не менее интересен как своей способностью связывать ганглиозид G_{M1} , так и механизмом действия. Этот токсин связывается со слизистой кишечника и стимулирует секреторные клетки тонкой кишки до такой степени, что организм теряет воду и электролиты в опасных количествах. Токсин холеры — белок с $M\,82\,000$; он не содержит углеводов и липиды и селективно взаимодействует с ганглиозидом G_{M1} . Этот белок состоит из нескольких полипептидных цепей: пяти В-цепей (с $M \sim 10\,000$), которые несут участки связывания ганглиозидов, но не дают холерной реакции, и субъединицы А ($M\,28\,000$), которая при проникновении в клетку активирует (в присутствии NAD) аденилатциклазу путем ее ковалентной модификации и постоянной активации регуляторной субъединицы фермента — G- (или N-) белка; в гл. 9 такие белки подробно обсуждаются в связи с катехоламиновыми рецепторами. Сама модификация заключается в ADP-рибозилировании, т. е. в переносе ADP-рибозы с NAD на α -цепь G-белка. В случае интактных клеток субъединица А токсина активна только в присутствии субъединиц В, которые, по-видимому, необходимы для связывания токсина с клеточной мембраной и проникновения через нее в клетку. Субъединицы А можно далее расщепить меркаптоэтанолом на A_1 ($M\,22\,000$) и A_2 ($M \sim 5000$). Белок A_1 все еще сохраняет способность активировать циклазу. Определение первичной структуры В-цепи [18] позволило выявить значительную гомологию с β -цепью тиреотропного гормона, что объясняет способность субъединиц β реагировать с рецепторами этого гормона в щитовидной железе.

Токсины столбняка и холеры сходны по своей структуре:

они содержат две полипептидные цепи, причем одна взаимодействует с мембраной, а другая токсична. Токсин дифтерии из *Corynebacterium diphtheriae* имеет такое же разделение функций (хотя по механизму действия он совершенно отличен от них и не взаимодействует с ганглиозидами), что позволяет трактовать механизмы белковой токсичности более широко. Кроме связывающей и каталитической субъединиц все три токсина содержат пептидную последовательность, позволяющую им пересекать

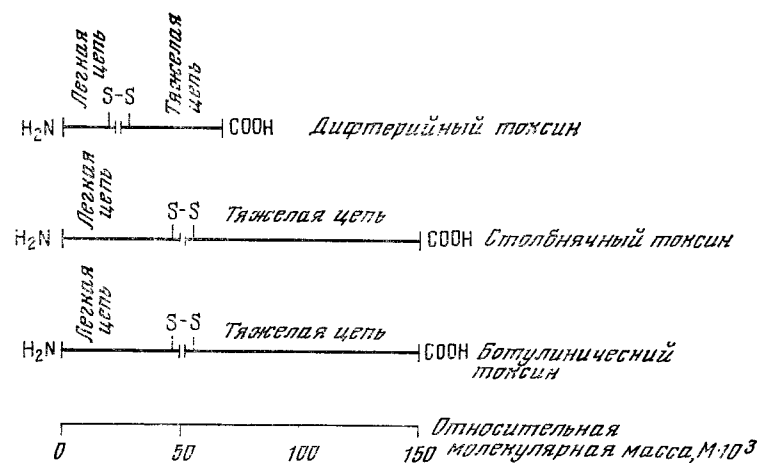


Рис. 2.15. Схема пептидных структур трех бактериальных токсинов. Все эти токсины состоят из легкой и тяжелой цепей, соединенных дисульфидной связью. Тяжелые цепи содержат центры связывания с мембраной и образуют каналы в мембране, которые могут функционировать как «туннели», позволяющие переместить активный фрагмент (локализованный на легкой цепи) внутрь зараженных клеток. Как и в случае токсина холеры, активный фрагмент дифтерийного токсина (ни один из них не является нейротоксином!) катализирует рибозилирование определенных белков. Активность легких цепей столбнячного и ботулинического токсинов не установлена.

клеточную мембрану, образуя своего рода туннель, через который каталитически активная цепь А может проскользнуть в клетку (рис. 2.15) [19]).

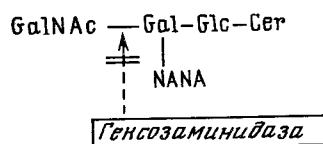
Липидозы обусловлены дефектами ферментов метаболизма гликолипидов

Известно по крайней мере десять генетических нарушений гликолипидного метаболизма, вызывающих болезни накопления липидов, или липидозы, называемые также *сфинголипидозами* [20, 21]. Эти заболевания неизлечимы и обычно приводят к ранней смерти.

Как показывает само название, сфинголипидозы вызываются дефектами ферментов катаболизма (деградации) сфинголипидов. Такие дефекты приводят к накоплению липида или промежуточного продукта его деградации. Причинами этих наследственных заболеваний являются нарушения генетически контролируемого синтеза расщепляющих ферментов. Известен также по крайней мере один случай, когда болезнь обусловлена дефектом не самого фермента, а белкового фактора, активируемого гидролазой и облегчающего связывание фермента с его липофильным субстратом.

Болезнь Тея-Сакса. а) Симптомы этой болезни состоят в том, что развитие новорожденного ребенка проходит нормально только до 6-месячного возраста, а затем появляются нарушения двигательной системы и психические расстройства, что ведет к судорогам, слепоте и близкой смерти (в течение трех лет). Характерным внешним признаком данного заболевания является вишнево-красное пятно на сетчатке глаз (симптом вишневой косточки).

б) Молекулярную основу болезни составляет накопление в мозге больных значительных концентраций ганглиозида G_{M2} (так называемого ганглиозида Тея — Сакса), отщепление от которого N-ацетилгалактозамина (GalNAc) становится невозможным из-за дефекта гексозаминидазы А.



Болезнь Тея — Сакса является так называемым В-вариантом группы G_{M2} -ганглиозидозов; дефектная гексозаминидаза А — один из двух изоформ гексозаминидазы, присутствующих в тканях человека. Имеется еще один, нулевой вариант этого заболевания (болезнь Сандхоффа — Яцкевича), при котором дефектен оба изоформа этого фермента, А и В. Имеется также особенно интересный вариант АВ G_{M2} -ганглиозидоза, при котором, несмотря на нормальную или даже повышенную активность обоих изоформов, происходит такое же накопление G_{M2} , как в двух предыдущих случаях. Здесь дефектными оказываются не сами расщепляющие ферменты, а белок-активатор, который способствует связыванию фермента с его липофильным субстратом [22].

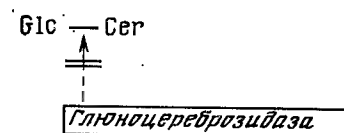
в) Генетически болезнь Тея — Сакса связана с аутосомно-рецессивной мутацией, присущей одному из трехсот жителей

США; среди еврейского населения США она встречается в 10 раз чаще.

г) Эффективных методов лечения этой болезни не существует. Инъекция большой дозы гексозаминидазы А не влияет на ход заболевания, так как фермент не проходит через гематоэнцефалический барьер.

Болезнь Гоше. а) Симптомы болезни состоят в заметном увеличении печени и селезенки, болях в бедренных костях и позвоночнике. Наблюдается прогрессирующий остеопороз позвоночника, а в костном мозге появляются большие липидсодержащие клетки, развивается анемия. Болезнь бывает различных типов в зависимости от возраста больных. У детей летальный исход наступает в течение двух лет.

б) Молекулярные основы. Эта болезнь — первый пример того, что при определенных липидозах накопление липидов происходит не в результате усиленного их синтеза, а из-за дефектов катаболизма. В случае болезни Гоше количество глюкоцереброзида увеличивается из-за неактивности или при некоторых типах этого заболевания низкой активности глюкоцереброзид- β -глюкозидазы (называемой также глюкоцереброзидазой).



в) Болезнь Гоше имеет генетическое происхождение и является аутосомно-рецессивной, т. е. у двух носителей заболевания один из четырех потомков заболевает. У гетерозиготных носителей гена болезнь не проявляется.

г) Лечение инъекциями цереброзидазы в некоторых случаях смягчает симптомы, но вообще эта болезнь так же неизлечима, как и многие другие генетически обусловленные метаболические заболевания. Профилактический подход более перспективен: тенденцию к заболеванию можно выявить у гетерозиготных носителей путем определения уровня активности соответствующего фермента в лейкоцитах или фибробластах кожи.

Болезнь Нимана — Пика. а) Клиническая картина этого заболевания характеризуется заметным увеличением печени и селезенки и прогрессирующим поражением мозга; смерть наступает в течение двух лет после рождения.

б) Молекулярной основой является накопление сфингомиелина. Дефектный фермент — это сфингомиелиназа, расщепляющая сфингомиелин на церамид и фосфорилхолин.



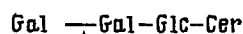
Сфингомиелиназа

в) Генетика. И в этом случае гетерозиготный носитель дефектного гена не заболевает, так как он ведет себя как рецессивный мутант.

г) Лечение до сих пор не разработано. Хотя сфингомиелиназа была выделена, инъекции требуют крайней осторожности, так как сфингомиелин является широко распространенным клеточным компонентом, и трудно избежать серьезных побочных эффектов, таких, как гемолиз.

Болезнь Фабри. а) Симптомы у мужчин выражены гораздо сильнее, чем у женщин; они состоят в ощущениях жжения рук и ног, усиленных неспособностью к потовыделению, атеросклерозе и нарушении работы почек. Смерть наступает обычно к пятидесяти годам жизни в основном от почечной недостаточности.

б) Молекулярные основы заключаются в накоплении тригексозида церамида (Cer-Glc-Gal-Gal), поскольку имеется дефект α -галактозидазы, необходимой для отщепления концевой остатка галактозы.



α -галактозидаза

в) Генетическая причина дефекта фермента заключается в аутосомальной рецессии на X-хромосоме.

г) Клиническая картина. Поскольку смерть наступает от почечной недостаточности, при трансплантации почки происходит некоторое улучшение. Довольно перспективно лечение внутривенными инъекциями α -галактозидазы, выделенной из плаценты человека. Фермент быстро поглощается, заметно уменьшает уровень церамидтригексозида в крови и у большинства пациентов возрастает ферментативная активность печени.

Другие заболевания, причинами которых являются нарушения, связанные с тем или другим ферментом катаболизма сфинголипида, приведены в табл. 2.4. Все они относительно редки и вызываются рецессивными мутациями, которые, по-видимому, не всегда приводят к полному отсутствию данного фермента, но иногда связаны с наличием его менее активной формы. В некоторых случаях антитела против активного фермента успешно использовались для обнаружения его неактивной мутантной формы.

Таблица 2.4. Сфинголипидозы (заболевания, обусловленные накоплением липидов)

Заболевание	Следствие нарушения метаболизма		
	Накапливается промежуточное соединение	Дефект фермента	Блокированная реакция (связь, атакуемая ферментом)
Болезнь Тей-Сакса	Ганглиозид Gm_2 (ганглиозид Тей-Сакса)	Гексозаминидаза А	$\text{GalNAc-Gal-Glc-Cer}$ $\uparrow$ NANA
Болезнь Гоше	Глюкоцереброзид	Глюкоцереброзидаза	Glc-Cer $\uparrow$ Холин-P-Cer
Болезнь Нимана-Пика	Сфингомиелин	Сфингомиелиназа	Gal-Gal-Glc-Cer $\uparrow$ NANA
Болезнь Фабри	Тригексозид церамида	α -Галактозидаза	$\text{GalNAc-Gal-Glc-Cer}$ $\uparrow$ NANA
Болезнь Сандхофа-Яккевича	Ганглиозид Gm_2 и глобозид	Гексозаминидаза А и В (оба изоэнзимы)	$\text{GalNAc-Gal-Glc-Cer}$ $\uparrow$ NANA
Общий ганглиозидоз	Ганглиозид Gm_1	Ганглиозид Gm_1 - β -галактозидаза	$\text{GalNAc-Gal-Glc-Cer}$ $\leftarrow$ Gal NANA
Болезнь Краббе	Неизвестно	Галактоцереброзид- β -галактозидаза	Gal-Cer $\uparrow$ Gal-Cer
Метахроматическая лейкодистрофия	Сульфатид	Галактоцереброзид-3-О-сульфатаза	Gal-Cer $\leftarrow$ OSO_3
Фукозидоз	Н-изоантиген	α -Фукозидаза	По-видимому, $\text{GalNAc-Gal-Glc-Cer}$ $\leftarrow$ фукоза
Болезнь Фарбера	Церамид	Церамидаза	$\text{Cer} \rightarrow$ сфингозин + жирные кислоты $\uparrow$

Углеводы придают специфичность поверхностям клеток; гликопротеины

От 2 до 10% массы плазматической мембраны может приходиться на углеводы, причем большинство из них связано с белками, и только малая часть — гликолипидами. Как уже было

упомянуто, практически все они локализованы на внешней поверхности плазматической мембраны и придают ей индивидуальность и специфичность [23].

Гликопротеины имеют относительно короткие олигосахаридные цепи, содержащие от 4 до 15 углеводных остатков. В них найдены следующие углеводы: D-галактоза, D-манноза, D-глюкозамин, D-глюкоза (редко), D-галактозамин (всегда в виде N-ацетильного производного), L-фукоза и N-ацетилнейраминная кислота. По аналогии с белками, первичные структуры которых строятся из 20 наиболее распространенных аминокислот, можно составить практически неограниченное число олигосахаридных структур с линейными или разветвленными цепями.

Так, было найдено расчетным путем число возможных структур (размещений) для олигосахарида, содержащего 13 углеводных остатков. При трех остатках каждого моносахарида: маннозы, N-ацетилглюкозамина, галактозы и N-ацетилнейраминной кислоты и связи с белком через еще один остаток N-ацетилглюкозамина, число возможных структур составляет $\sim 10^{24}$!

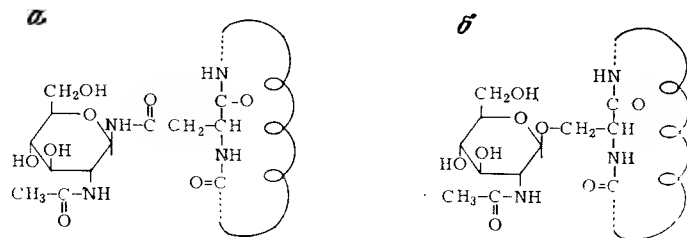


Рис. 2.16. Гликопротеины. а — N-гликозидная связь N-ацетилглюкозамина с аспарагиновым остатком белка; б — O-гликозидная связь N-ацетилглюкозамина с сериновым остатком белка.

Углеводные цепи гликопротеинов связаны либо с остатками аспарагина N-гликозидной связью, либо с остатками серина или треонина O-гликозидной связью (рис. 2.16).

Биосинтез этих двух типов цепей протекает по-разному. O-Гликозидная связь образуется путем прямого переноса остатка углевода от динуклеотидмоносахарида (например, UDP-глюкозы) на OH-группу белка (рис. 2.17).

N-Гликозидная связь сахара с аспарагином образуется через промежуточную стадию связывания сахара с липидом — полипренолом долихолом, структура которого приведена на рис. 2.18 [24, 25] (для бактерий $n=11$; для млекопитающих $n=17 \div 21$). Схема биосинтеза гликопротеина приведена на рис. 2.19.

Неясно, почему гликозилирование происходит то через промежуточную стадию связывания с долихолом, то минуя ее.

Поскольку долихолы липофильны, их участие может указывать на то, какие стадии биосинтеза протекают вблизи от липофильной части мембраны.

Каждая молекула гликопротеина может включать несколько идентичных олигосахаридных цепей, которые специфичны для данного белка. Однако последовательности олигосахаридов necessarily должны быть полными: один или более моносахаридов могут отсутствовать. Структура олигосахаридов определяется специфическими гликозилтрансферазами. Гликопротеины групп крови являются примером специфических структур олигосахаридов этого типа: олигосахариды группы крови А отличаются от олигосахаридов группы крови В тем, что содержат на концах двух разветвлений цепи концевые остатки N-

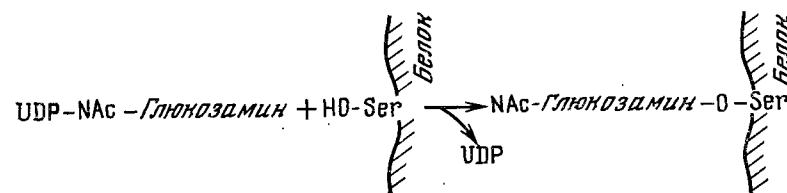


Рис. 2.17. Перенос UDP-активированного сахара на сериновую гидроксильную группу белка.

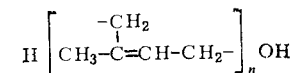


Рис. 2.18. Полипренол долихол — промежуточный липид, участвующий в биосинтезе N-гликозидной связи гликопротеинов.

ацетилгалактозамина вместо остатков галактозы, а гликопротеин группы крови 0 вовсе не содержит углеводных остатков в этих положениях. Очевидно, что специфичность поверхности нервных мембран может создаваться подобным же образом.

Гликопротеины важны для специфичности формирования нервных связей

Каковы функции гликопротеинов в биологических процессах? Одна из гипотез связывает их с внутриклеточной сортировкой белков, которые синтезируются в шероховатом эндоплазматическом ретикулуме и транспортируются к месту назначения по еще неизвестному механизму. Углеводные боковые цепи вновь синтезированного гликопротеина могут служить «флагом», который определит, будет ли он включен в какую-либо опреде-

ленную мембрану или будет секретирован в межклеточную среду. Из-за большого разнообразия и специфичности олигосахаридов кажется вполне возможным, что гликопротеины и ганглиозиды играют специфическую роль в клеточном узнавании и контакте, а следовательно, и в правильном формировании сети нейронов мозга. Углеводные цепи соседних клеток могли бы специфически взаимодействовать по одному из трех предполагаемых механизмов (рис. 2.20):

1) взаимодействие между остатками сахаров двух клеток, например посредством образования водородных связей;

2) взаимодействие типа антиген — антитело;

3) фермент-субстратное взаимодействие, т. е. мембранно-связанная гликозилтрансфераза одной клетки может узнавать свой субстрат — соответствующий олигосахарид другой клетки — и связываться с ним.

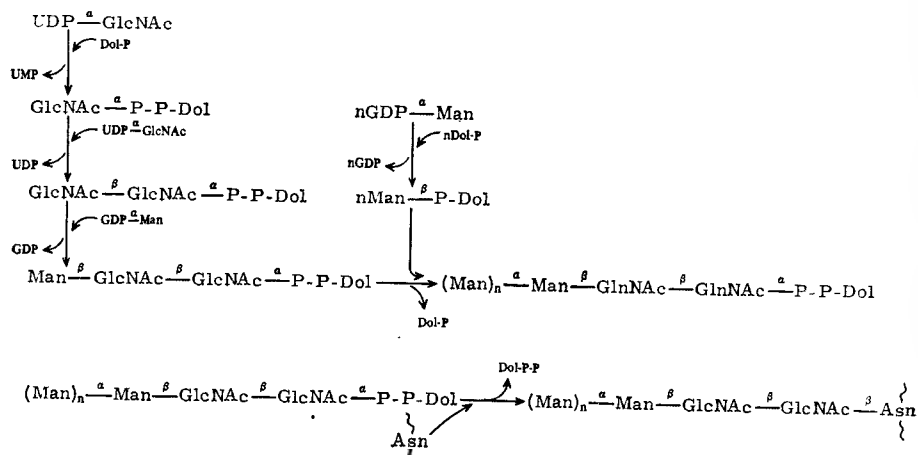


Рис. 2.19. Биосинтез гликопротеина с предполагаемым участием производных долихола (Dol) на промежуточных стадиях [24].

Третий механизм подтверждается многими наблюдениями. Но в то же время известны клетки, которые проявляют нормальную адгезию (и контактное ингибирование) в клеточной культуре, хотя у них и не удается обнаружить наличие мембранно-связанных галактозилтрансфераз. Таким образом, эта элегантная гипотеза теряет некоторую долю привлекательности, и вопрос о клеточном узнавании и адгезии остается открытым. Именно здесь нейробиолог может найти ключ к решению таких проблем, как специфичность структуры 10^{14} синапсов центральной нервной системы, так как ни в пре- или постсинаптических мембранах, ни в промежуточных базальных пластинках недостатка в гликопротеинах не наблюдается.

В одной из следующих глав мы еще вернемся к проблеме специфичности межклеточных взаимодействий и ее связей с образованием сложной сети нейронов.

Выводы

Плазматическая мембрана состоит из фосфолипидов, стерина, гликолипидов и гликопротеинов, а также ионов металлов и воды. Все эти компоненты — не просто строительные блоки, т. е.

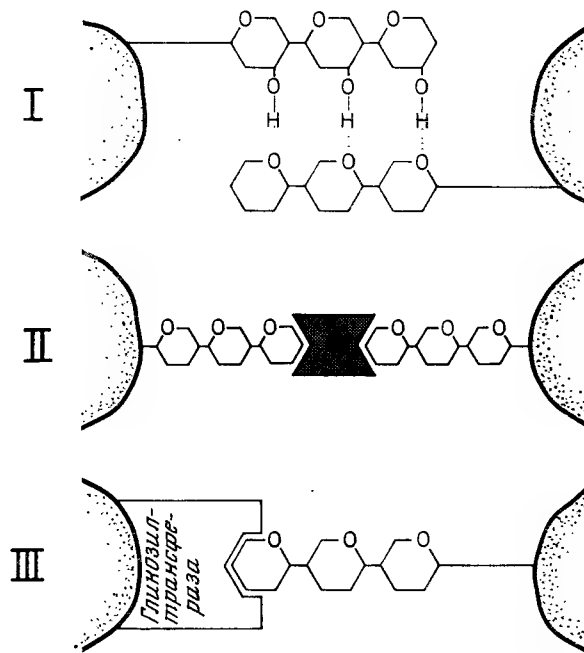


Рис. 2.20. Гипотетические механизмы специфического межклеточного узнавания и адгезии с участием олигосахаридов плазматической мембраны. I — водородное связывание; II — взаимодействие типа антиген-антитело; III — фермент-субстратное взаимодействие.

структурные элементы, они вовлечены самыми разными способами в кооперативную активность. Соотношение различных молекул в мембранах сильно варьирует. Все еще нет ясной связи между липидным составом и функцией мембран, поскольку мембраны, имеющие одинаковые функции, могут иметь разный состав (например, мембраны эритроцитов). Невозможно, исходя из состава, однозначно определить такие понятия, как, например, мембраны эритроцитов или аксонов.

Биосинтез фосфолипидов происходит из глицеро-3-фосфата через его диацильный эфир — фосфатидовую кислоту. Из фосфатидовой кислоты при действии СТР образуется активированная СМР-фосфатидовая кислота, которая затем этерифицируется серином с образованием фосфатидилсери́на и инозитом — с образованием фосфатидилинозита. Декарбоксилирование фосфатидилсери́на ферментом, содержащим пиридоксальфосфат, приводит к образованию фосфатидилэтанолamina, который метилируется затем по аминогруппе S-аденозилметиони́ном до фосфатидилхолина. С другой стороны, серин, этанолamin и холин могут при действии СТР образовывать активированные производные, дающие затем при реакции с диацилглицерином фосфатидилсерин, фосфатидилэтанолamin и фосфатидилхолин. Метилирование фосфатидилэтанолamina двумя молекулами метилтрансферазы стимулируется определенными нейромедиаторами и является важной стадией передачи сигнала через клеточную мембрану.

Исходное вещество при биосинтезе сфинголипидов — сфингозин — получается при конденсации палмитоилкофермента А и серина, последующем декарбоксилировании и окислении. Его аминогруппа амидируется жирной кислотой, что приводит к церамиду. Гидроксильная группа церамида может реагировать с различными лигандами, образуя: 1) сфингомиелин при реакции с фосфорилхолином; 2) цереброзид при реакции с углеводом (галактозой или глюкозой); дальнейшая этерификация серной кислотой дает сульфатид; 3) ганглиозиды при превращении в олигосахарид, содержащий различное число остатков N-ацетилнейраминовой кислоты. Галактоцерамид (цереброзид) находится главным образом в белом веществе мозга, ганглиозиды — в сером веществе. Ганглиозиды, видимо, концентрируются в синаптической области нейронов и могут иметь отношение к функционированию синапсов и их правильному связыванию в сети. Биологическая функция этих веществ до сих пор окончательно не выяснена. Бактериальные токсины помогают подойти к определению этой функции. Столбнячный, ботулинический и холерный токсины, по-видимому, содержат ганглиозидсвязывающий центр как сходный структурный элемент, который соединен с другой полипептидной цепью через S—S-мостик. Токсическая функция локализована в этой второй полипептидной цепи: у токсина холеры (не являющегося нейротоксином!) токсическая функция заключается в активации аденилциклазы, а у ботулинического токсина — в пресинаптическом блокировании высвобождения медиатора.

Нарушения деградации сфинголипидов приводят к группе заболеваний, называемых сфинголипидозами, и все десять известных типов этих заболеваний имеют рецессивный генетиче-

ский характер. Причиной липидозов являются дефекты ферментов катаболизма, приводящие к накоплению соответствующего липида в центральной нервной системе и в других органах (печени, селезенке). Только иногда симптомы удается снять путем введения нормального фермента, заменяющего дефектный.

Гликопротеины содержат олигосахаридные цепи, структуры которых придают исключительное специфичное разнообразие поверхностям мембран. Эти цепи связаны с остатками серина или треонина через O-гликозидные связи или с аспарагиновыми остатками через N-гликозидные связи. Связывание осуществляется непосредственно через UDP-сахара или в случае N-гликозидов через промежуточные долихоловые производные с участием специфических гликозилтрансфераз. Функции олигосахаридных цепей гликопротеинов в адгезии клеток и узнавании еще предстоит выяснить.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Gurr M. I., James A. T., Lipid Biochemistry, An Introduction, Chapman and Hall, London, 1975.
2. De Vries G. H., Hadfield M. G., Cornbrooks C., The isolation and lipid composition of myelin-free axons from rat CNS, J. Neurochem., 26, 725—731 (1976).
3. Norton W. T., Abe T., Poduslo S. E., De Vries G. H., The lipid composition of isolated brain cells and axons, J. Neurosci. Res., 1, 57—75 (1975).
4. Hirata F., Axelrod J., Phospholipid methylation and biological signal transmission, Science, 209, 1082—1090 (1980).
5. Michell R. H., Inositol phospholipids and cell surface receptor function, Biochim. Biophys. Acta, 145, 81—147 (1975).
6. Berridge M. J., Irvine R. F., Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction, Nature, 312, 315—321 (1984).
7. Cockcroft S., Gomperts B. D., Role of guanine nucleotide binding protein in the activation of polyphosphoinositide phosphodiesterase, Nature, 314, 534—536 (1985).
8. Nishizuka Y., The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion, Nature, 308, 693—697 (1984).
9. Ленинджер А. Основы биохимии: В 3-х томах, М.: Мир, 1985.
10. Fishman P. H., Brady R. O., Biosynthesis and function of gangliosides, Science, 194, 906—915 (1976).
11. Rahmann H. H., Rösner H., Breer H., A functional model of sialoglycomacromolecules in synaptic transmission and memory formation, J. theor. Biol., 56, 231—237 (1976).
12. Svennerholm L., Chromatographic separation of human brain gangliosides, J. Neurochem., 10, 613—623 (1963).
13. Maggio B., Cumar F. A., Caputto R., Molecular behaviour of glycosphingolipids in interfaces. Possible participation in some properties of nerve membranes, Biochim. Biophys. Acta, 650, 69—87 (1981).
14. Van Heyningen S., The structure of bacterial toxins, TIBS, 1, 114—116 (1976).
15. Van Heyningen S., Binding of ganglioside by the chains of tetanus toxin, FEBS Lett., 68, 5—7 (1976).

16. *Das Gupta B. R., Sugiyama H.*, A common subunit structure in *Clostridium botulinum* type A, B and E toxins, *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **48**, 108—112 (1972).
17. *Sugiyama H., Das Gupta B. R., Yang K. H.*, Disulfide-toxicity relationship of botulin toxin types A, E, and F, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **143**, 589—591 (1972).
18. *Nakashima Y., Napiorkowski P., Schäfer D. E., Königsberg W. H.*, Primary structure of the B subunit of cholera enterotoxin, *FEBS Lett.*, **68**, 275—278 (1973).
19. *Hoch D. H., Romero-Mira M., Ehrlich B. E., Finkelstein A., Das Gupta B. R., Simpson L. L.*, Channels formed by botulinum, tetanus, and diphtheria toxins in planar lipid bilayers: Relevance to translocation of proteins across membranes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 1692—1696 (1985).
20. *Sandhoff K.*, Biochemie der Sphingolipidspeicherkrankheiten, *Angew. Chem.*, **89**, 283—295 (1977).
21. *Brady R. O.*, Inherited metabolic storage disorders, *Ann. Rev. Neurosci.*, **5**, 33—56 (1982).
22. *Conzelmann E., Sandhoff K.*, AB variant of infantile G_{M2} gangliosidosis, deficiency of a factor necessary for stimulation of hexosaminidase A-catalyzed degradation of ganglioside G_{M2} and glycolipid G_{a2} , *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 3979—3983 (1978).
23. *Olden K., Parent J. B., White S. L.*, Carbohydrate moieties of glycoproteins. A re-evaluation of their function, *Biochim. Biophys. Acta*, **650**, 209—232 (1982).
24. *Waechter C. J., Lennarz W. J.*, The role of polyprenol-linked sugars in glycoprotein synthesis, *Ann. Rev. Biochem.*, **45**, 95—112 (1976).
25. *Kornfeld R., Kornfeld S.*, Assembly of asparagine-linked oligosaccharides, *Ann. Rev. Biochem.*, **54**, 631—664 (1985).

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА

По липидам и плазматическим мембранам

Bretscher M. S., Raff M. C., Mammalian plasma membranes, *Nature*, **258**, 43—49 (1975).

См. также работу [1] в «Цитированная литература» и учебники по биохимии.

По гликопротеинам

Lennarz W. J. (ed.), *The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans*, Plenum Press, New York & London, 1980.

Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. D., *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing, Inc., New York and London, 1983.

По болезням накопления гликолипидов

Brady R. O., Inherited metabolic storage disorders, *Ann. Rev. Neurosci.*, **5**, 33—56 (1982).

По фосфатидилинозиту и воротам Ca^{2+} -канала

Fisher S. K., Van Rooyen L. A., Agranoff B. W., Renewed interest in the polyphosphoinositides, *TIBS*, **9**, 53—56 (1984).

Berridge M. J., Irvine R. F., Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction, *Nature*, **312**, 315—321 (1984).

МЕМБРАНЫ

Согласно определению, в сложном организме нервная система является органом коммуникации. Эта специфическая функция выполняется мембранами нервных клеток. Например, прохождение нервного импульса вдоль аксона, который может достигать метра в длину, приводит к возникновению потенциала действия, формирующегося в результате кратковременного переноса ионов через аксональную мембрану (гл. 5 и 6). Аналогично основные стадии передачи импульса от одной клетки к другой — это химические и электрические явления на синаптической мембране (гл. 8 и 9). Нервные мембраны играют также важную роль при развитии нервной системы и в ее взаимодействии с окружающей средой. Итак, в настоящее время биохимия нервной мембраны составляет значительную часть современной нейробиологии. По существу эта глава представляет собой краткое изложение основ современной мембранологии, поданных со специфических позиций нейробиолога. Для более полного ознакомления с мембранологией следует обратиться, например, к двум последним монографиям [1, 2].

Нейрональная мембрана является плазматической

Мы знаем очень мало о структуре нейрональной мембраны, но если осознать, что она является в принципе плазматической и во многих отношениях подобна плазматическим мембранам клеток других типов, то на нее можно перенести многие общие результаты исследований мембран независимо от того, получены ли они на бактериях, грибах и эритроцитах или на миелине.

Рассмотрим некоторые аспекты «общей мембранологии», имеющие существенное значение для нейробиологии. Любая удовлетворительная мембранная модель должна ответить на следующие основные вопросы, касающиеся взаимосвязи структуры и функции мембраны:

1. Может ли обсуждаемая модель согласовать все данные, касающиеся состава мембран, с информацией, полученной методами электронной микроскопии, рентгеноструктурного анализа, и другими физическими методами?

2. Как учитывает предлагаемая модель основные биологические свойства мембран:

а) существование барьера между наружным и внутренним пространством клетки, причем не только для органических молекул, но также (что особенно важно в случае нейрона) для ионов;

б) тот факт, что мембрана является активной кооперативной системой, поддерживающей постоянно внутриклеточного состава посредством активного транспорта метаболитов и ионов;

в) аспект индивидуальности клетки, проявляющейся, например, в ее специфической антигенности. Этот аспект важен для межклеточной коммуникации и узнавания и может выражаться во временных контактах, адгезии или слиянии клеток. Он приобретает особенное значение при развитии нервной системы для установления правильных синаптических контактов в растущей сети нейронов, а также на внутриклеточном уровне — при экзоцитозе синаптических везикул и высвобождении медиатора;

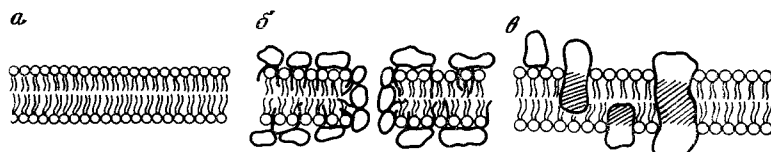


Рис. 3.1. Модели мембран. а — бислойная модель липидных мембран; б — модель Даниелли — Давсона. Этот и более поздние варианты модели помещают белки главным образом на поверхность бислоя. Гидрофобные области белка проникают в липидную фазу. Белки образуют также поры в мембране; в — модель Синджера — Николсона, различающая интегральные и периферические белки (см. текст). Гидрофобные части интегральных белков погружены в липидную фазу или пронизывают ее насквозь (см. также рис. 3.4).

г) свойства мембраны как рецептивной поверхности, способной с помощью специфических встроенных в нее рецепторов узнавать сигналы, поступающие из окружающей среды от гормонов, трофических факторов или медиаторов.

От мембранных моделей Гортера и Гренделя до моделей Синджера и Николсона

Более 50 лет назад (в 1925 г.) Гортер и Грендель экстрагировали липиды из мембран эритроцитов и приготовили из них мономолекулярную пленку на поверхности воды. Они показали, что площадь поверхности такой пленки в два раза больше площади поверхности интактных эритроцитов, и сделали вывод, что эритроциты окружены не мономолекулярным, а бимолекулярным липидным слоем (рис. 3.1, а). По значимости эту концеп-

цию *липидного бислоя* как основы биологических мембран можно сравнить с открытием двойной спирали ДНК. Основной причиной существования липидного бислоя является строение липидной молекулы, состоящей из полярной гидрофильной «головки» и неполярных гидрофобных «хвостов» жирных кислот (рис. 3.2). В водной среде эти молекулы самоорганизуются в

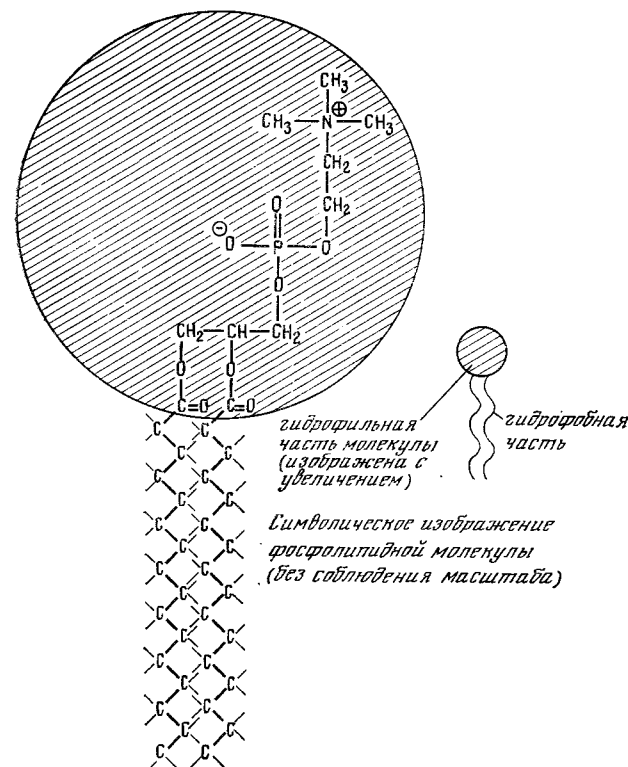


Рис. 3.2. Амфипатическая фосфолипидная молекула.

термодинамически выгодные структуры, в которых их гидрофильные полярные головки взаимодействуют с молекулами воды, а гидрофобные углеводородные цепи, отталкиваемые водой, взаимодействуют друг с другом, как в капле жира. Такие возможные структуры — *мицеллы*, *монослои*, *липосомы* (липидные везикулы) — показаны на рис. 3.3. Изображенные липосомы уже обладают характерной бислойной структурой биологических мембран.

Мы не будем приводить здесь аргументы «за» и «против» бислойной модели. Эта интереснейшая глава истории науки описана в многочисленных монографиях, специально посвященных мембранам. Основная концепция бислойной структурной организации клеточных мембран стала вскоре общепринятой, и некоторые разногласия касались только расположения в мембране белков. Согласно модели Даниелли и Давсона, белки размещались на поверхности бислоя, где они должны были удерживаться электростатическими силами. Поскольку при этом липидный бислой оказывался заключенным между двумя слоями белка, как масло между двумя ломтиками хлеба, такая модель стала называться моделью «сэндвича», или, говоря научным языком, «унитарной мембранной моделью». Для того чтобы белки покрывали поверхность мембраны как можно более

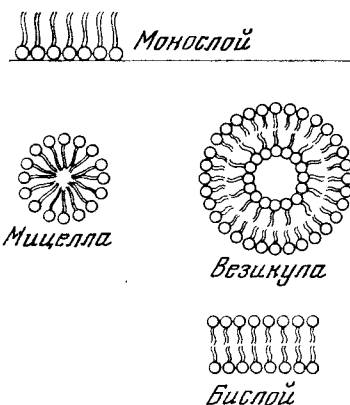


Рис. 3.3. Липидные структуры в гидрофильном окружении.

полно, Даниелли должен был предположить, что они находятся на мембране не в глобулярной, а в полностью «развернутой» конформации. В гл. 4 мы увидим, что миелин действительно лучше всего соответствует этой модели, поскольку он содержит специфический белок с основными свойствами, принимающий развернутую конформацию и адсорбирующийся на поверхности бислоя в результате взаимодействия с кислыми полярными головками фосфолипидов. Но в миелине содержатся также другие белки, которые размещаются не так, как предсказывает модель Даниелли — Давсона.

Ни теоретические соображения, ни экспериментальные наблюдения не подтверждают модель «сэндвича». Представляется термодинамически маловероятным, чтобы белок успешно конкурировал с водой за полярные головки липидных молекул и слой белка мог бы экранировать их от водного окружения. Имеются также многочисленные экспериментальные данные, противоречащие такой модели, из которых самое очевидное — это электронно-микроскопическая картина мембраны, полученная методом «замораживание — скалывание» (рис. 3.4). На микрофотографии видны частицы, возможно белки, на внутренней поверхности бислоя. Биохимические методы также подтверждают заключение, что белки частично или целиком встроены в мембрану. Позднее мы еще вернемся к этому вопросу.

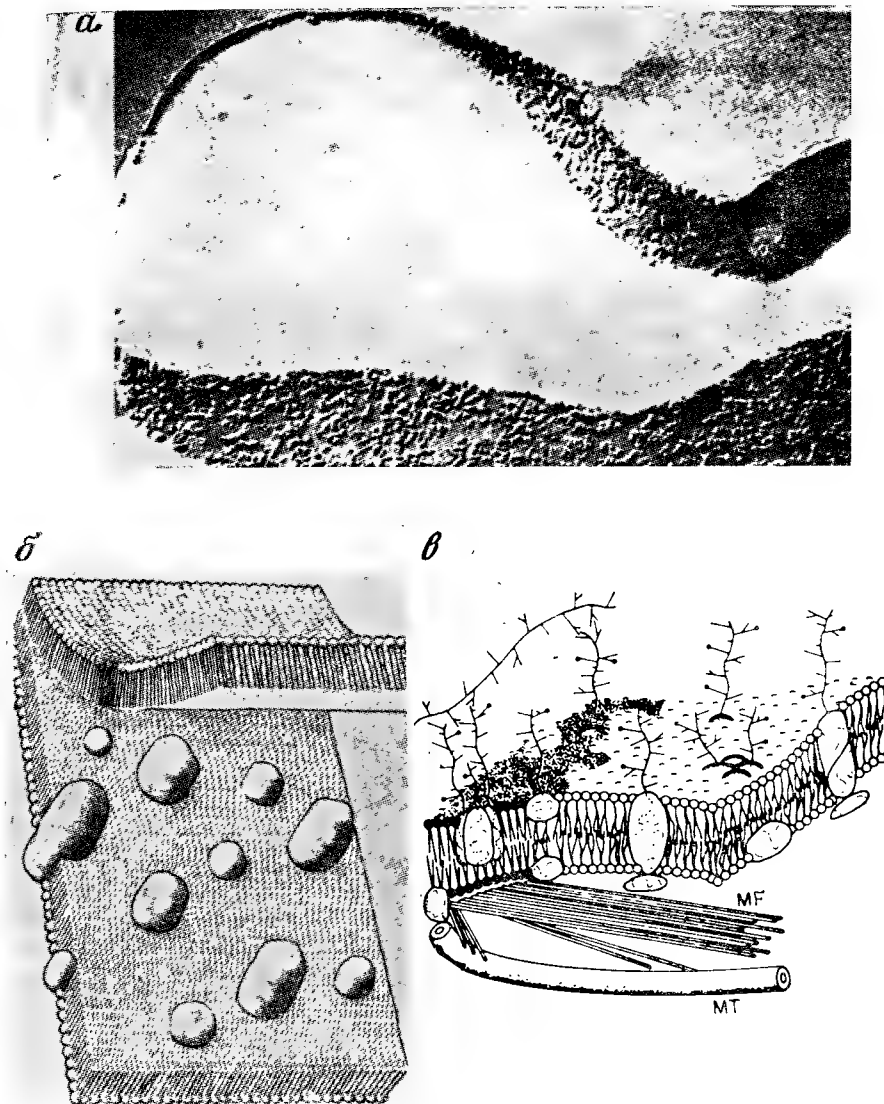


Рис. 3.4. Жидкомозаичная модель мембраны. *а* — электронная микрография клеточной мембраны, полученная методом замораживания — скалывания. В нескольких местах бислой расколот, и видна внутренняя часть мембраны. Видимые частицы являются, вероятно, белками или их агрегатами (из работы Сильва и Брентона; цитировано по [1]); *б* — схема скола с погруженными белками (из работы Тагава; цитировано по [1]); *в* — белки погружены в липидную фазу, олигосахариды выступают во внеклеточное пространство, а цитоскелет размещен внутри клетки; MF — микрофиламенты, MT — микротрубочки [Nicolson G. L., Biochim. Biophys. Acta, 1976, v. 457, p. 57—108].

В 1972 г. Синджер и Николсон, обобщив все имеющиеся данные, создали модель, названную «жидкомозаичной» [3]. В настоящее время считается общепринятым, что эта модель наиболее адекватно описывает плазматическую мембрану.

Модели — не копии реально существующих структур

Жидкомозаичная модель мембраны — это, однако, не более чем просто схематическое изображение, всего лишь рабочая гипотеза. В этой книге, как и в других учебных изданиях, приведено довольно много моделей, что, вообще говоря, не очень по душе автору. На моделях кажется все понятным; они выглядят вполне правдоподобными; и именно это может легко увести читателя от понимания того факта, что ценность моделей весьма относительна и временна. Любой хорошо поставленный эксперимент может их модифицировать или опровергнуть. Использование модели в учебнике может создать ложное представление надежности там, где это далеко еще не устоявшаяся теория, а слепое следование ей (*idee fixe*) может затруднить обсуждение экспериментальной проверки теории. Еще одна опасность заключается в том, что модели обычно излишне обобщены; здесь они могут чрезмерно подчеркивать общие свойства самых разных мембран, затемняя тем самым различия, которые могут быть важными для понимания их специфических функций.

Свойства мембран и их липидной фазы взаимосвязаны

От модели Синджера мы перейдем к липидному бислою как матриксу или структурной фазе, в которую погружены белки. Липидный бислой ни в коем случае не следует рассматривать как пассивную или жесткую структуру.

Биомембраны — «жидкокристаллические» структуры

Если из липида приготовить искусственную мембрану, то в зависимости от температуры она будет находиться в двух фазовых состояниях [4]: «более жидком» или «более твердом».

Однако не совсем верно описывать переход из одной такой формы в другую как плавление и затвердевание; более точно говорить о *жидкокристаллической фазе*, существующей выше температуры фазового перехода, и о *кристаллической фазе* ниже этой температуры. В обеих фазах липидные молекулы находятся по большей части в упорядоченном состоянии: их полярные головки направлены наружу, а гидрофобные радикалы жирных кислот — внутрь липидной фазы. В жидкокристаллической фазе гидрофобные цепи, особенно их концы,

относительно мобильны, а в кристаллической фазе они закреплены.

Фазовый переход из кристаллического в жидкокристаллическое состояние является эндотермическим процессом; количество тепла, необходимое для «плавления» цепей жирных кислот, можно определить в калориметре (рис. 3.5). Если липидный бислой состоит только из одного липида, то фазовый переход происходит в узком интервале температур. Так как биологические мембраны обычно состоят из большого количества раз-

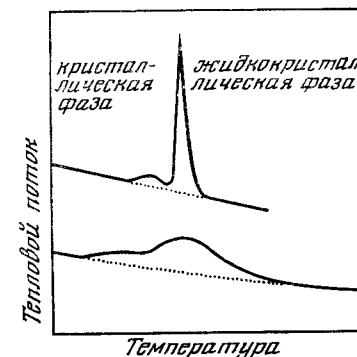


Рис. 3.5. Фазовые переходы в фосфолипидной мембране. При определенной температуре мембрана переходит из кристаллического в жидкокристаллическое состояние; это — эндотермический процесс, который можно измерить калориметрически. Прибавление холестерина размывает температуру перехода (нижняя кривая), а при содержании холестерина >50% фазовый переход не обнаруживается. При физиологических условиях биологическая мембрана всегда находится при температуре выше температуры фазового перехода, т. е. является жидкокристаллической.

ных липидов, они не имеют четко выраженного фазового перехода и при физиологических температурах являются жидкокристаллическими. Однако очевидно, что текучесть биологических мембран может быть весьма различной как в разных органах, так даже и в разных частях мембраны одной клетки. На это указывает различный липидный состав разных мембран или их доменов. Хотя еще не установлена общая зависимость между текучестью мембран и их биологической функцией, некоторые факторы, влияющие на текучесть, были выявлены в экспериментах на искусственных липидных мембранах. Накапливаются данные, свидетельствующие о том, что те же факторы действуют и в биомембранах. Температура фазового перехода зависит от природы боковых цепей жирных кислот. Чем длиннее цепь и чем меньше она содержит двойных связей, тем выше эта температура, т. е. чем длиннее цепь, тем сильнее взаимодействия Ван-дер-Ваальса между соседними цепями. Более длинные цепи сильнее «заякорены», что уменьшает текучесть мембраны. Наоборот, двойная связь, существующая *in vivo* преимущественно в *цис*-конфигурации, нарушает взаимодействие между цепями и приводит к повышению текучести мембраны.

Это приложимо ко всем биомембранам. Бактерии, растущие при низких температурах, поддерживают текучесть своих мем-

бран посредством включения в них коротких и ненасыщенных жирных кислот. Рыбы приводят липидный состав своих мембран в соответствие с температурой окружающей среды аналогичным образом. Зависимость текучести мембраны от липидного состава играет важную роль в ее функционировании. Например, в экспериментах с мутантными штаммами *E. coli*, неспособными синтезировать жирные кислоты и извлекающими их из окружающей среды, зависимость транспорта галактозидов через мембрану от температуры определялась липидным составом питательной среды [5].

Влияние отдельных липидов на свойства мембраны описать нелегко. В общем можно только сказать, что текучесть биологических мембран определяется температурой фазового перехода отдельных липидов. Факторы, увеличивающие текучесть (см. выше), приводят к следующим изменениям:

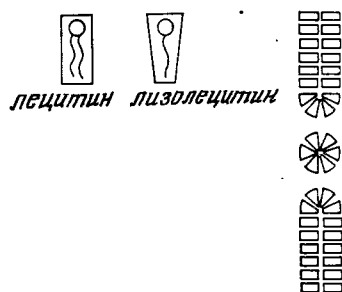


Рис. 3.6. Лизолецитин повреждает липидные мембраны. Справа — схема литического действия на бислой.

а) к латеральному расширению мембраны, что уменьшает ее толщину;

б) к увеличению числа конформационных переходов в боковых цепях липидов в результате вращения вокруг С—С-связей;

в) к увеличению подвижности $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+$ -групп;

г) к увеличению латеральной диффузии липидов.

Лизолецитин повреждает мембраны

Лизолецитин образуется из лецитина путем отщепления одного из остатков жирной кислоты при действии фосфолипаз A_1 или A_2 . Мы уже упоминали в гл. 2, что лизолецитин является промежуточным соединением при образовании и распаде липидов, что он очень быстро реагируется и, вероятно, играет важную роль при поддержании определенного липидного состава мембраны. Лизолецитин не должен накапливаться в клетке, так как он заметно разрушает бислойную структуру клеточной мембраны. Схематически этот процесс изображен на рис. 3.6.

Легко показать наличие такого процесса в эритроцитах: гемолитическое действие змеиного яда, содержащего липазы, обусловлено главным образом образованием лизолецитина. Интересна еще одна роль лизолецитина. Если добавить его в низких концентрациях к липосомам или к эритроцитам цыпленка, то вместо полного лизиса происходит слияние клеток. Возмож-

но, лизолецитин также участвует в слиянии мембран *in vivo*, как это было предположено в случае экзоцитотического высвобождения молекул медиатора из хромаффинных гранул. Лизолецитин может разрыхлять участвующие в этом процессе мембраны с тем, чтобы медиатор легче проходил через них.

Мембраны, содержащие холестерин, не являются ни кристаллическими, ни жидкокристаллическими

Включение холестерина между цепями жирных кислот мембран нарушает их расположение и раздвигает их [6]. В кристаллической фазе это приводит к увеличению текучести, тогда как в жидкокристаллической фазе мембрана становится более жесткой, т. е. холестерин уменьшает подвижность цепей жирных кислот. Из-за ингибирования кристаллизации и увеличения текучести мембраны, содержащие >20% холестерина (такие, как миелин), практически не имеют фазового перехода. Они существуют в промежуточном полукристаллическом состоянии. Биологическое значение этого явления может заключаться в том, что подавляя взаимодействие между другими липидными молекулами, холестерин может блокировать перенос «информации» в мембране.

Не только цепи жирных кислот, но и полярные группы липидов характеризуют мембрану. При этом именно полярные головки могут резко различаться в индивидуальных биологических мембранах. Они могут быть более существенными для липид-белковых, чем для липид-липидных взаимодействий, и для нормального функционирования отдельные белки могут нуждаться в специфических липидных полярных группах. Это уже было показано в случае многих ферментов [7] (см. ниже).

Лекарственные препараты влияют на текучесть мембраны

Кроме эндогенных имеются и другие факторы, которые влияют на текучесть липидного матрикса. Многочисленные нейротоксины и нейротропные лекарства действуют на нервную мембрану (гл. 6, 8, 9), причем некоторые из них связываются со специфическими или рецепторными участками, а другие оказывают неспецифическое действие на общие свойства мембраны. К числу последних относятся, например, местные анестетики.

Механизм действия как общих, так и местных анестетиков очень сложен и пока еще малопонятен [8]; более подробно этот вопрос обсуждается в гл. 6. Теория, предложенная Мейером и Овертоном в начале века, сохраняет свое значение и сейчас, хотя с определенными уточнениями. Согласно этой теории, анестезирующая способность соединения зависит главным образом

от его липофильности, т. е. от коэффициента распределения между мембраной и водой. Модельные эксперименты показали, что анестетики снижают температуру фазового перехода некоторых липидов и, таким образом, увеличивают текучесть мембраны [9, 10]. Текучесть связана с проницаемостью мембраны для ионов и других низкомолекулярных веществ. В своем классическом эксперименте Бенгхем показал, что липосомы, содержащие радиоактивное вещество, при действии хлороформа или диэтилового эфира становились проницаемыми и выделяли радиоактивную метку в окружающую среду. Концентрация хлороформа, необходимая для этого эффекта, была достаточной для анестезии головастика. Бенгхем предположил, что один и тот же молекулярный механизм отвечает как за проницаемость мембраны, так и за анестезирующий эффект, и подтвердил этот вывод следующим экспериментом.

Он уменьшил текучесть липосом, увеличив давление в 90 раз. Липосомы стали непроницаемыми, и выделение радиоактивной метки в окружающую среду при действии хлороформа прекратилось. Одновременно прекратилось и действие анестетика на головастиков, и они проснулись. Очевидно, при повышении давления восстановилась структура мембраны, а следовательно, и ее функция.

Механизм действия местных анестетиков, однако, более сложен, чем может показаться из этих опытов. Так, например, в мембранах аксонов натриевая проницаемость блокируется селективно. Различные механизмы местной анестезии обсуждаются в гл. 6. Здесь же отметим, что в общем имеются достаточные доказательства связи между эффективностью этих препаратов и их влиянием на текучесть мембран. При действии местных анестетиков увеличивается, например, агглютинация клеток млекопитающих лектинами растений [10], что опять-таки подтверждает связь их действия с текучестью клеточной мембраны.

Влияние ионов на липидные мембраны

Чтобы рассмотреть взаимосвязь между подвижностью молекул, составляющих бислой, и его функцией, мы должны подробнее обсудить формы такой подвижности. Это колебания и вращение отдельных групп или боковых цепей липидных молекул, а также латеральная диффузия целых липидных молекул в своем монослое. Липидная молекула в липосоме меняется местами с соседними молекулами 10^6 раз/с. Однако ее переход с одной стороны бислоя на другую сторону совершается только один раз в 14 сут. Этот так называемый «флип-флоп», или третий тип подвижности, практически не вносит вклада в подвижность мембраны.

Важным фактором, влияющим на подвижность всех трех типов, является ионный состав водной среды, окружающей мембрану [11]. Катионы повышают температуру фазового перехода. Связывание катионов с отрицательно заряженными головками фосфолипидов зависит от величин их положительных зарядов: ионы щелочных металлов связываются слабее, чем ионы щелочноземельных металлов, Na^+ — примерно так же, как K^+ , а Ca^{2+} сильнее, чем все другие ионы его группы. Связывание усиливается в следующем ряду: $(\text{CH}_3)_4\text{N}^+ \approx (\text{C}_2\text{H}_5)_4\text{N}^+ \approx$ ацетилхолин $< \text{Na}^+ \approx \text{K}^+ < \text{NH}_4^+ < \text{Li}^+ < \text{Ba}^{2+} < \text{Sr}^{2+} < \text{Mg}^{2+} < \text{Ca}^{2+}$ < двухзарядные ионы переходных элементов.

Действие ионов кальция особенно интересно для нейробиологии. Они увеличивают электрическое сопротивление искусственных липидных мембран, т. е. стабилизируют их, если присутствуют в одинаковых концентрациях по обе стороны мембраны. Напротив, присутствие ионов кальция только с одной стороны мембраны понижает сопротивление и дестабилизирует мембрану, а при $[\text{Ca}^{2+}] > 1$ мМ мембрана разрушается. Нечто подобное электрофизиологи наблюдали и в нервной мембране. Они показали, что «порог» генерации потенциала действия и, следовательно, временного увеличения ионной проницаемости аксональной мембраны понижается при уменьшении концентрации кальция во внешней среде (гл. 6). Ионы кальция влияют на упаковку и подвижность липидных молекул в бислой. Они повышают температуру фазового перехода, тем самым стабилизируя кристаллическое состояние. Однако перенесение результатов, полученных на искусственных мембранах, на истинные биологические мембраны означает приложение данных, полученных на простых биофизических системах, к гораздо более сложным биологическим системам. Например, описанные катионные эффекты сильно зависят от анионов, белков и липидной гетерогенности биомембраны.

Асимметрия биологических мембран

Хотя бислойная модель предполагает симметричную структуру, при которой поверхность раздела монослоев является плоскостью симметрии, теперь мы знаем, что эта концепция ошибочна. Белки, углеводы и липиды в бислое распределены асимметрично. Эти данные, как и многие другие основополагающие концепции мембранологии, были получены при изучении мембран эритроцитов [12]. Есть многочисленные свидетельства того, что и нервная мембрана устроена аналогичным образом.

В лабораториях Бретчера, Гордески и ван Деенена были разработаны методы определения липидной асимметрии в бислойной структуре [13]. При этом липиды, расположенные

на внешней поверхности клеток, исследовались по реакции с фосфолипазами, а липиды, локализованные на внутренней стороне бислоя, — по обмену с липидными везикулами. В случае мембран эритроцитов липиды, расположенные на обеих сторонах мембраны, изучались по реакции с FDNB (1-фторо-2,4-динитробензолом), способным легко диффундировать через мембрану, а липиды наружной стороны мембраны — по реакции с TNBS (2,4,6-тринитробензолсульфокислотой), неспособной проникать внутрь клетки. Эти эксперименты показали, что сфингомиелин и фосфатидилхолин локализованы главным образом

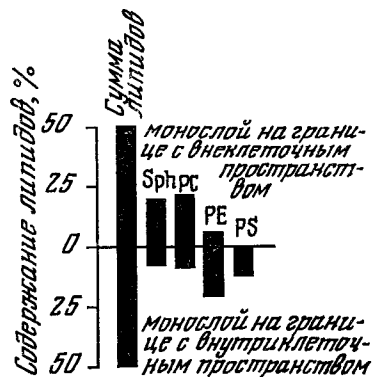


Рис. 3.7. Асимметрия биологических липидных мембран. Анализ отдельных типов фосфолипидов в мембранах эритроцитов [30] показывает их неодинаковое распределение между двумя монослоями бислоя. Sph — сфингомиелин, PC — фосфатидилхолин, PE — фосфатидилэтаноламин, PS — фосфатидилсерин.

Углеводы и белки также распределены в бислое асимметрично

Углеводные цепи ганглиозидов и цереброзидов находятся исключительно на внешней стороне клеточной мембраны. Хотя такая мембранная асимметрия ярко выражена, биологическая ее значимость совершенно неясна. Мы уже обсуждали этот факт в гл. 2. Гораздо больше известно о мембранных белках. Исследования последних 10 лет, проведенные с использованием самых различных методов, привели к одинаковому

на внешней стороне мембран, а фосфатидилсерин и фосфатидилэтаноламин — на внутренней (цитоплазматической) ее стороне (рис. 3.7). Кроме того, оказалось, что часть липидов, по-видимому, не принадлежит к какой-либо стороне бислоя, а связана с белками и, возможно, окружает их как жесткие «воротники».

Для объяснения биологического значения асимметрии выдвинуты различные теории. Так, например, асимметрия может быть обусловлена асимметричным расположением белков в мембране. Таким образом, фосфатидилсерин, необходимый для функционирования АТРаза, может быть сконцентрирован во внутреннем монослое благодаря ассоциации с этим белком.

выводу: мембранные белки расположены в мембране асимметрично. В модели Даниелли (1934 г.) белки размещались в виде слоя сферических молекул над полярными группами липидов по обе стороны мембраны (модель «сэндвича»). Расчеты показали, что общего количества белка недостаточно, чтобы покрыть весь бислой глобулярными белками. Даниелли уточнил модель в 1937 г., предположив, что часть белка находится в развернутой, т. е. β -конфигурации, а его гидрофобные участки пронизывают мембрану. Мы знаем теперь, что даже эта модель слишком проста и не согласуется со многими наблюдениями.

Жидкомозаичная модель Синджера и Николсона [3] различает два типа мембранных белков: периферические и интегральные. Периферические белки удерживаются на поверхности мембраны в основном ионными взаимодействиями и относительно легко солюбилизируются, например, путем увеличения ионной силы. Интегральные белки погружены в липидную фазу и не могут быть высвобождены из мембраны без хотя бы частичного ее разрушения. Они нерастворимы в воде, гидрофобны и липофильны. Эта характеристика двух классов мембранных белков предполагает, что они асимметрично распределены в клеточной мембране: периферические белки находятся только по одну сторону бислоя, тогда как интегральные проникают в нее — чаще только в один монослой; если же они пронизывают весь бислой, то тогда они функционально асимметричны. Пример асимметрии последнего типа — транспортные системы, такие, как Na^+ , K^+ -АТРаза (гл. 7).

Для исследования локализации интегральных белков в мембране используются различные методы [14]. Среди них наиболее предпочтительными благодаря своей селективности являются ферментативные. С помощью протеаз, например, если действовать ими сначала на наружную, а затем на внутреннюю поверхности мембраны, можно определить, различна ли структура и функция белка на разных сторонах бислоя. Было показано, в частности, что при перфузии аксона проназой, мишенью действия фермента оказались белки, участвующие в инактивации натриевого канала, и, следовательно, они должны быть размещены на внутренней стороне мембраны. Если же проназой действовали извне, то на инактивацию натриевого канала она почти не влияла (гл. 6).

Особенно полезным для изучения локализации белков оказался лактопероксидазный метод [15] (рис. 3.8).

Если белок иодировать радиоактивным ^{125}I с помощью лактопероксидазы, то этот фермент, будучи неспособным проникнуть через мембрану, может действовать соответственно месту своего применения только на белки, расположенные на внешней или внутренней поверхности. В реакции иодирования

принимает участие H_2O_2 ; и хотя механизм этой реакции не ясен, результат достаточно однозначен: иодируются только остатки тирозина и гистидина. Селективность реакции повышается, если концентрацию пероксида водорода поддерживать в ходе галогенирования низкой путем ее генерирования с помощью другой ферментативной реакции, катализируемой глюкозоксидазой.

Из неферментативных методов здесь стоит упомянуть только метод мечения сульфгидрильных групп. Ионный SH-реагент *n*-хлормеркурибензоат не проникает через мембрану и поэтому реагирует с белком только на той поверхности бислоя, со стороны которой он действует. Другие, менее полярные реагенты, такие, как *N*-этилмалеимид, реагируют с SH-группами как на поверхности, так и в глубине мембраны.

Интегральные мембранные белки сами по себе, по-видимому, всегда асимметричны. Неизвестно ни одного примера, когда белковая молекула была бы целиком заключена между липид-



Рис. 3.8. Лактопероксидазный метод иодирования остатков тирозина в белках. Ферментативное иодирование затрагивает только поверхностные белки и поэтому может использоваться для локализации белков в клеточной мембране.

ными монослоями мембраны и оказалась бы недоступной ни с одной стороны. Во всех случаях одна часть белковой молекулы гидрофобна и встроена в мембрану, а другая гидрофильна и находится в контакте с водным окружением. Таким образом, интегральные белки *амфифильны*. Иногда они имеют особенно высокое содержание гидрофобных аминокислот. Амфифильная структура может возникнуть также в результате скопления гидрофобных остатков в одной части аминокислотной последовательности. Имеются данные, что эта гидрофобная часть молекулы пронизывает мембрану, находясь в спиральной форме. α -Спиральная конфигурация обеспечивает особенно гибкое решение этой структурной проблемы, так как в ней полярные группы пептидных связей направлены внутрь, а неполярные боковые цепи аминокислотных остатков — наружу. Такая амфифильная конструкция впервые доказана для гликофорина А мембраны эритроцитов [12] (рис. 3.9). Аминокислотная последовательность этого соединения обнаруживает все основные положения модели, изображенной на рис. 3.9: гидрофобная

часть, состоящая из последовательности между аминокислотными остатками 73 и 92, заключена между N- и C-концевой гидрофильными последовательностями. Гидрофильность N-концевой последовательности 1—73 значительно усиливается благодаря присутствию 16 олигосахаридных боковых цепей, на которые приходится 60% молекулярной массы гликопротеина. Эта часть молекулы, находящаяся в развернутой конформации, простирается вовне мембраны. Центральная гидрофобная часть молекулы формируется, вероятно, в цилиндрическую α -спираль, пронизывающую мембрану; а C-концевая последовательность, содержащая также довольно большое число кислых аминокислотных остатков (93—131), образует второй гидрофильный участок молекулы, который в глобулярной форме локализуется на внутренней поверхности мембраны. В гл. 7 мы познакомимся с бактериородопсином, который пронизывает мембраны галофильных бактерий и является светозависимым протонным насосом. Для этого белка α -спиральная структура прекрасно выявлена посредством электронной микроскопии высокого разрешения (рис. 7.12). Структурно аналогичен этим белкам цитохром b_5 эндоплазматического ретикулума [17]. Он отщепляется от мембран протеазами, оставляя в них свой гидрофобный «якорь». Секвенирование этого «якоря» доказало для него ожидаемую гидрофобную структуру. Никотиновый ацетилхолиновый рецептор (гл. 9) — еще один пример такой структурной организации — его гидрофобные спирали пронизывают мембрану и «заякоривают» гидрофильные белковые структуры.

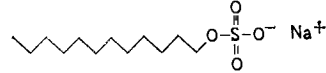
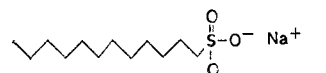
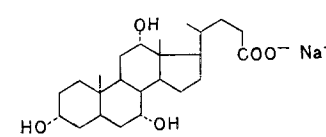
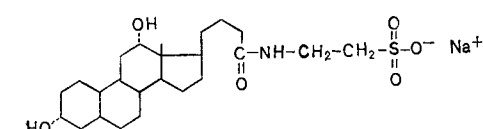
Липид-белковые взаимодействия приводят к разделению фаз и асимметрии мембраны

Гидрофобная полипептидная цепь может специфически связываться с каким-то одним типом липидов, и это способно обеспечивать разделение фаз и асимметрию липидного матрикса.

Мембранные белки, за немногим исключением, связываются с окружающими их липидами нековалентно. Методами ЭПР с помощью спинмеченных липидов доказано, что такие белки собирают вокруг себя специфические липиды в форме «воротника», или ореола. Кроме того, модельные исследования на искусственных липосомах, сформированных из фосфатидилсерина и фосфатидилхолина, показали, что основной белок человеческого миелина (гл. 4) связывается с кислыми и нейтральными липидными молекулами, вызывая тем самым разделение фаз [18]. Аналогичный эффект в модельных экспериментах с искусственными липосомами проявлял и липопротеин миелиновой мембраны [19]. Напротив, никотиновый ацетилхолиновый рецептор из электрического органа *Torpedo* преимущественно

фильной головкой и гидрофобным хвостом и проявляют амфипатичность. Выше определенной концентрации — критической концентрации мицеллообразования (ККМ) — они образуют устойчивые сферические агрегаты (мицеллы) (рис. 3.3). В зависимости от природы гидрофильных групп мягкие детергенты можно разделить на неионные, ионные или цвиттер-ионные (рис. 3.10). Для ионных детергентов величины ККМ составляют несколько миллимолей, а для неионных эта характеристика на порядок ниже.

а) Ионные детергенты

	ККМ, ммоль/л
	додецилсульфат натрия (SDS) 8,2
	додецилсульфонат натрия 9,8
	холат натрия 10,0
	тауродезоксихолат натрия 2,0

б) Неионные детергенты

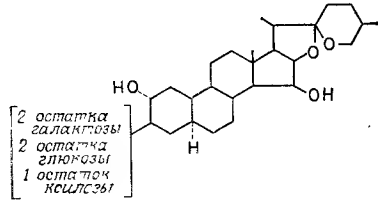
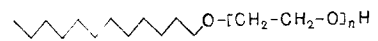
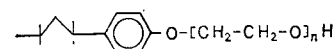
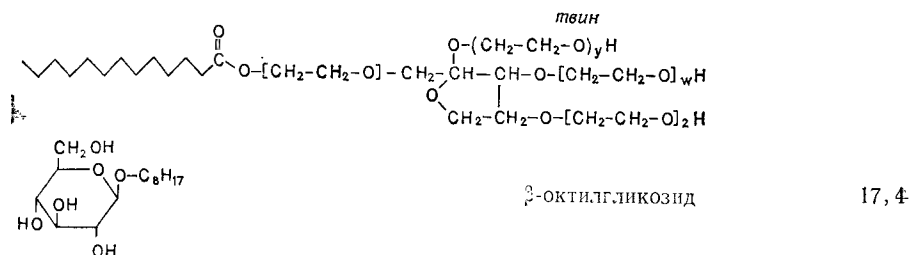
	дигитонин	
	бридж, лубролы W и AL, эмульфоген BC, ренекс 30, стероксы AJ и AP	
	тритон X	0,24

Рис. 3.10. Детергенты. (В формуле тауродезоксихолата натрия циклическая часть структуры приведена с ошибкой.)



в) Цвиттер-ионные детергенты

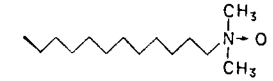
	додецилдиметиламмоний-оксид (DDAO)	8,4
$\text{R}-\text{CO}(\text{NH})(\text{CH}_2)_3\text{N}^+(\text{CH}_3)_2-(\text{CH}_2)_3\text{SO}_3^-$	CHAPS	
$\text{R}=\text{холат}$	CHAPSO	4-6

Рис. 3.10 (продолжение).

Детергенты растворяют природные мембраны, образуя вместе с их липидами смешанные мицеллы. В случае мембранных белков они замещают их эндогенные липиды и образуют мицеллы вокруг гидрофобных участков белков (рис. 3.11). Если же детергенты затем удалить, например диализом или просто разбавлением, белок становится вновь нерастворимым. Возможно, что при этом молекулы белка агрегируют, поскольку они начинают контактировать своими собственными гидрофобными участками и сами образовывать нечто вроде мицелл.

Некоторые детергенты, например тритон X-100, луброл, бридж, холат и дезоксихолат, как уже описывалось, просто растворяют мембрану и солюбилизируют интегральные белки. Другие же детергенты существенно повреждают белки, сильно влияя на их структуру, вплоть до необратимой денатурации. Поэтому действие детергентов непредсказуемо, и его следует проверять в каждом отдельном случае.

Искусственные липидные мембраны — модели биологических мембран

Постоянная дилемма, с которой приходится сталкиваться нейробиологам и биохимикам, изучающим мембраны, заключается в том, что для исследования функционально важных молекул мембран необходимо выделить их, т. е. удалить из окружения, обеспечивающего их функционирование. Однако при этом могут

быть потеряны важнейшие свойства таких молекул, что особенно справедливо для транспортных белков, которые по определению не могут функционировать вне мембраны. Биохимик же может изучать только структурные свойства очищенного мембранного белка, но не механизм его функционирования. Один из подходов, разрешающих эту дилемму, заключается в воссоздании мембраны, т. е. во введении очищенного мембранного белка в искусственную липидную мембрану, где он вновь восстанавливает свою функцию. Преимущество такой воссозданной системы по сравнению с биологической состоит в том, что с ней можно работать при строго определенных условиях и с хорошо очищенными веществами, так что, например, транспортный белок может быть единственным белком в искусственной мембране, а его липидное окружение может быть легко проконтроли-

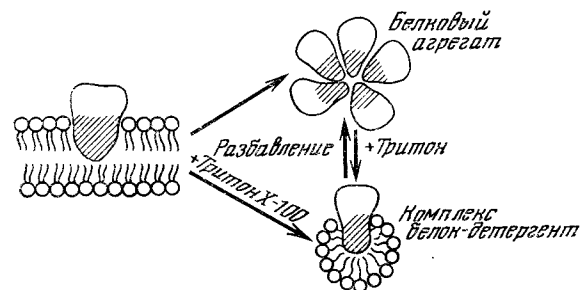


Рис. 3.11. Солюбилизация мембраны неионным детергентом тритоном X-100. Детергент размещается на гидрофобном участке белка и замещает мембранные липиды. Если концентрация детергента ниже его ККМ, белок сам образует мицеллы или агрегаты, которые часто выпадают в осадок.

ровано экспериментатором. Таким путем можно выяснить, какой именно компонент биологической мембраны необходим для проявления исследуемой функции и при каких иных условиях (ионная сила, pH, мембранный потенциал) система функционирует. Поскольку этот метод становится все более важным для нейробиологии, мы приведем здесь краткий обзор преимуществ и недостатков искусственных липидных систем и методов их построения.

Искусственные липидные системы делятся на везикулярные и планарные (рис. 3.3). Методы исследований, основанные на использовании искусственных липидных везикул, экспериментально проще и требуют менее дорогой аппаратуры, но обычно они дают меньше информации, чем планарные системы. Во многих случаях они используются как компромисс или как предварительный этап на пути воссоздания планарной мембранной системы, а данные, полученные с их помощью, носят скорее

качественный, чем количественный характер. Везикулярные системы особенно удобны для измерения потоков через мембраны радиоактивно меченных соединений, а также спектроскопических (в том числе ЯМР, ЭПР) измерений. Количественное изучение липид-белковых взаимодействий, и особенно ионной проницаемости, эффективнее осуществлять на планарных липидных системах. Из-за экспериментальных трудностей число удачно воссозданных систем все еще невелико.

В основу методики положено недоказанное еще положение молекулярной биологии о том, что биомолекулы содержат в

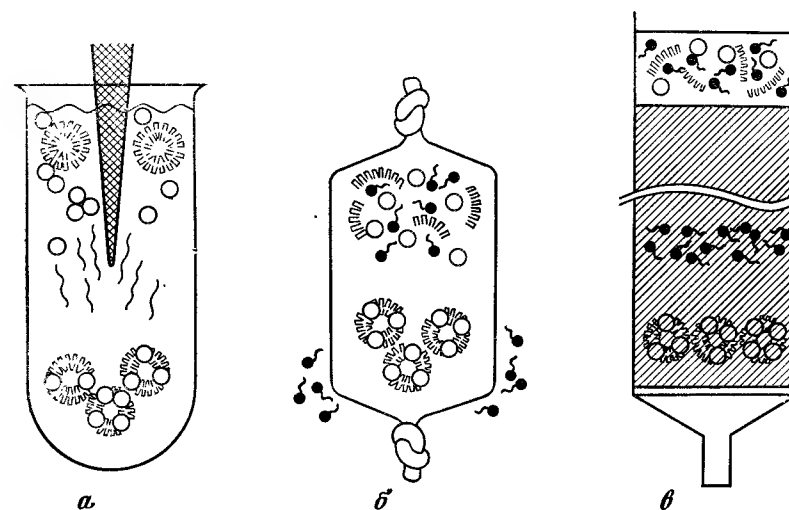


Рис. 3.12. Воссоздание везикулярных липид-белковых систем. Кружочки — молекулы белка, «воротца» — молекулы липида. а — путем обработки ультразвуком водной суспензии мембранного белка и липида образуются липидные везикулы, содержащие в бислое белок; б — воссоздание липид-белковых везикул в водном растворе липида и белка, стабилизированном детергентом (черные кружочки с хвостиком — молекулы детергента); детергент удаляют диализом; в — тот же процесс, но удаление детергента осуществляют гель-хроматографией.

своей структуре всю необходимую информацию для образования структур более высокого порядка. Биомембраны — это *самособирающиеся системы*.

Наиболее часто для воссоздания везикулярных протеолипидных систем используются следующие методы (рис. 3.12):

- 1) ультразвуковая обработка липидов, суспендированных в белок-содержащей среде [25];
- 2) диализ раствора липида и белка в детергенте [26];

3) гель-фильтрация раствора липида и белка в детергенте [27].

При этом предполагается, что липидная везикула (липосома) в водном растворе термодинамически более стабильна, чем единичная липидная молекула или плоская пленка таких молекул. При ультразвуковой обработке или при удалении детергента возникающая везикула захватывает молекулы белка, если они гидрофобны и поэтому находятся в термодинамически невыгодном окружении. У гидрофобных белков имеются две возможности стабилизации: либо посредством агрегации друг с другом, либо путем включения в липидную фазу. Если экспериментатору повезет, то происходит последнее. В самое последнее время удалось приготовить большие (~ 50 мкм в диаметре) везикулы, которые можно изучать электрофизиологическими методами с помощью введения в них микроэлектродов или даже методом подключения клемм [31].

В экспериментах по воссозданию планарных липидных мембран могут быть использованы как моно-, так и бислои. Монослой формируют на поверхности раздела вода — воздух. Каждый липид имеет характерную, зависящую от его структуры площадь поверхности, а это означает, что вместо прямого измерения поверхности монослоя для определения тенденции липида распространяться по ней, т. е. оказывать так называемое *поверхностное давление*, можно использовать торсионные весы. Прибор для такого рода измерений называется *ванной Ленгмюра*. С его помощью можно количественно следить за воссозданием липид-белковой системы, ибо, когда белок встраивается в монослой, поверхностное давление меняется в соответствии с пространственными требованиями его молекулы. Так, если какой-то белок входит в субфазу под монослоем, то изменение поверхностного давления в ванне Ленгмюра регистрирует его включение в мембрану. Путем изменения состава липидного монослоя можно определить, какой липид взаимодействует со специфическим белком. Например, этим методом было найдено, что ацетилхолиновый рецептор постсинаптической мембраны взаимодействует лучше с холестерином, чем с фосфолипидами [20]. Такая информация, следовательно, имеет не только теоретический интерес; она может оказаться необходимой для успешного воссоздания мембраны.

Искусственные бислойные мембраны можно получить двумя способами:

1. Каплю раствора липида в декане вводят в отверстие перегородки, разделяющей два отсека пластиковой ячейки (рис. 3.13). По мере того как растворитель уходит из раствора в результате диффузии, капля липида самопроизвольно утончается, образуя в конце концов бислой, известный как *черная*

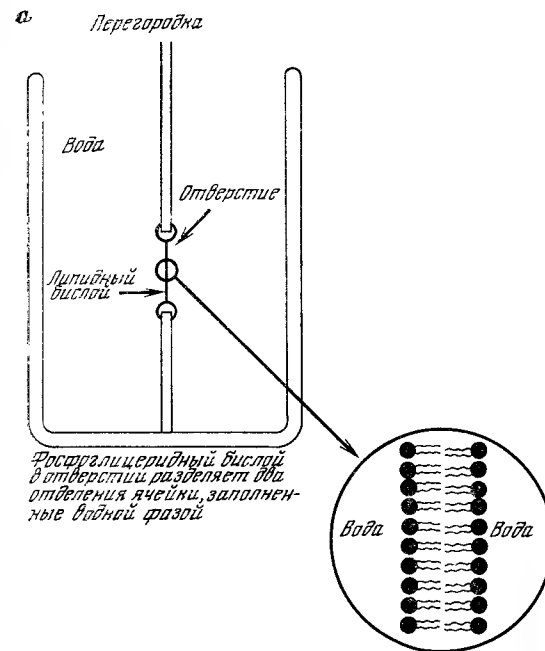


Рис. 3.13. а — схема прибора для воссоздания «черных липидных мембран» и их изучения. Тefлоновая ячейка разделена перегородкой с отверстием. Когда капля липида в органическом растворителе наносится на отверстие, она образует (после удаления растворителя) плоский липидный слой — черную мембрану. Если теперь в оба отделения ячейки ввести по электроду, то можно измерить электропроводность слоя. Встраивание белка в мембраны вызывает изменение в электропроводности, которое можно измерить; б — получаемые данные (пример): на осциллограмме записаны флуктуации силы тока, проходящего через лецитиновую мембрану, содержащую грамицидин А — порообразующий антибиотик; каждое отклонение отражает работу одного канала; амплитуда отклонения регистрирует электропроводность, т. е. число ионов, пересекающих мембрану за единицу времени, период колебания — продолжительность существования канала. (Предоставлено д-ром Бамбергом, Франкфурт).

липидная мембрана, поскольку окраска липидной пленки меняется от коричневой до черной (метод Мюллера — Рудина [28]).

2. Липид распространяется в виде монослоя на поверхности воды, а затем два таких монослоя «натягиваются» на отверстие в подвижной гидрофобной перегородке (метод Монтала — Мюллера [29]).

Белки можно включать в бислой либо прибавлением их к липидному раствору перед формированием мембраны, либо введением в уже сформировавшийся бислой посредством диффузии. Применение черных липидных мембран (black lipid membranes, BLM) оказалось особенно успешным для изучения низкомолекулярных пептидных ионофоров, таких, как антибиотики грамицидин и валиномицин. Кинетику их ионного транспорта удалось проанализировать детально: было показано, что валиномицин — ионофор, а грамицидин, напротив, димеризуется, образуя в мембране поры. Этот метод настолько чувствителен, что позволил количественно изучать свойства единичных ионных каналов, их ионную селективность, максимальную проводимость и время жизни.

С использованием таких методов было успешно проведено воссоздание систем натрий-калиевого насоса (Na^+ , K^+ -АТФазы), Ca^{2+} -АТФазы (гл. 7), родопсина и бактериородопсина, а также белков нервных и мышечных тканей, таких, как никотиновый ацетилхолиновый рецептор и потенциалзависимый натриевый канал аксональных мембран. Многие из опубликованных данных об удачных воссозданиях искусственных систем следует, однако, рассматривать с осторожностью, так как свойства таких систем слишком сильно отличались от свойств их биологических прототипов.

Выводы

Нейрональная мембрана, рассматриваемая как цитоплазматическая мембрана, несет в клетке не только пассивную структурную функцию. Она служит барьером для поддержания внутриклеточного состава и функций клетки (ионы, электрический потенциал, метаболиты) и для ее компартментации (клеточные органеллы, везикулы нейромедиаторов), играет активную (ионные насосы, ферменты) и пассивную (ионные каналы, высвобождение медиатора) роли при передаче нервного импульса. Она обладает специфическими характеристиками, необходимыми для развития нервной системы и установления синаптических связей (клеточная адгезия и узнавание). Она проводит также межклеточные сигналы (гормоны, медиаторы, лекарства).

До сих пор нейрональная мембрана лучше всего описывается жидкомозаичной моделью С. Дж. Синджера, основанной

на концепции бислоя и учитывающей такие характеристики, как текучесть и асимметрия. На текучесть влияет состав цепей жирных кислот, содержание холестерина, ионы (например, Ca^{2+}) и лекарственные препараты (например, местные анестетики). На асимметрию влияют липиды (фосфатидилсерин и фосфатидилэтаноламин внутри клетки, фосфатидилхолин и сфингомиелин на наружной стороне мембраны), углеводы (на наружной стороне) и белки (интегральные или периферические). Белки могут частично погружаться в мембрану или пронизывать ее, причем в последнем случае преимущественно участвуют, по-видимому, гидрофобные последовательности белка в α -спиральной конформации. Структура и активность мембранных белков стабилизируются липидами. Так называемые мягкие детергенты могут заменять мембранные липиды и солюбилизовать мембраны; при этих условиях многие мембранные молекулы теряют свои функции по определению (например, транспортные белки). Для изучения «выделенных» мембранных белков предпринимаются попытки воссоздавать функциональные системы путем встраивания этих белков в искусственные планарные (черные) мембраны или везикулярные липидные системы.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Weissmann G., Claiborne R. (eds.), Cell Membranes. Biochemistry, Cell Biology and Pathology, Hospital Practice Publishing Co., New York, 1975.
2. Finean J. B., Coleman R., Mitchell R. H., Membranes and Their Cellular Function, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1974.
3. Singer S. J., Nicolson G. L., The fluid mosaic model of the structure of cell membranes, Science, 175, 720—731 (1972).
4. Lee A. G., Lipid phase transitions and phase diagrams, Biochim. Biophys. Acta, 472, 237—282, 285—344 (1977).
5. Overath P., Hill F. F., Lamnek-Hirsch I., Biogenesis of *E. coli* membrane: evidence for randomization of lipid phase, Nature (London) New Biol., 234, 264—267 (1971).
6. Demle R. A., De Kruyff B., The function of sterols in membranes, Biochim. Biophys. Acta, 457, 109—132 (1976).
7. Coleman R., Membrane-bound enzymes and membrane ultrastructure, Biochim. Biophys. Acta, 300, 130 (1973).
8. Lee A. G., Model for action of local anaesthetics, Nature, 262, 545—548 (1976).
9. Papahadjopoulos D., Jacobson K., Poste G., Shepard G., Effects of local anaesthetics on membrane properties. I. Changes in the fluidity of phospholipid bilayers, Biochim. Biophys. Acta, 394, 509—519 (1975).
10. Poste G., Papahadjopoulos D., Jacobson K., Vail W. J., Effects of local anaesthetics on membrane properties. II. Enhancement of the susceptibility of mammalian cells to agglutination by plant lectins, Biochim. Biophys. Acta, 94, 520—539 (1975).
11. Hauser H., Levine B. A., Williams R. J. P., Interactions of ions with membranes, TIBS 1, 278—281 (1976).
12. Marchesi V. P., Furthmayr H., Tomita M., The red cell membrane, Ann. Rev. Biochem., 45, 667—698 (1976).

13. Bergelson L. D., Barsukow L. I., Topological asymmetry of phospholipids in membranes, *Science*, **197**, 224—230 (1977).
14. Maddy A. H. (ed.), *Biochemical Analysis of Membranes*, John Wiley and Sons, New York, 1976.
15. Morrison M., Schonbaum G. R., Peroxidase-catalyzed halogenation, *Ann. Rev. Biochem.*, **45**, 861—888 (1976).
16. Hubbard A. L., Cohn Z. A., The enzymatic iodination of the red cell membrane, *J. Cell Biol.*, **55**, 390—405 (1977).
17. Ozols J., Gerard C., Primary structure of the membranous segment of cytochrome b_5 , *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 3725—3729 (1977).
18. Boggs J. M., Moscarello M. A., Papahadjopoulos D., Phase separation of acidic and neutral phospholipids induced by human myelin basic protein, *Biochemistry*, **16**, 5420—5426 (1977).
19. Boggs J. M., Wood D. D., Moscarello M. A., Papahadjopoulos D., Lipid phase separation induced by a hydrophobic protein in phosphatidylserine-phosphatidylcholine vesicles, *Biochemistry*, **16**, 2325—2329 (1977).
20. Gennis R. B., Protein-lipid interactions, *Ann. Rev. Biophys.*, **6**, 195—238 (1977).
21. Sandermann H., Regulation of membrane enzymes by lipids, *Biochim. Biophys. Acta*, **515**, 209—237 (1978).
22. Helmkamp G. M., Harvey M. S., Wirtz K. W. A., van Deenen L. L. M., Phospholipid exchange between membranes. Purification of bovine brain proteins that preferentially catalyze the transfer of phosphatidylinositol, *J. Biol. Chem.*, **249**, 6382—6389 (1974).
23. Bloj B., Zilvermit D. B., Rat liver proteins capable of transferring phosphatidylethanolamine, *J. Biol. Chem.*, **252**, 1613—1619 (1977).
24. Helenius A., Simons K., Solubilization of membranes by detergents, *Biochim. Biophys. Acta*, **145**, 29—79 (1975).
25. Kagawa Y., Racker E., Partial reconstitution of the enzyme catalyzing oxidative phosphorylation, *J. Biol. Chem.*, **246**, 5477—5487 (1971).
26. Racker E., A new procedure for the reconstitution of biological active phospholipid vesicles, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **55**, 224—230 (1973).
27. Brunner J., Skrabal P., Hauser H., Single bilayer vesicles prepared without sonication. Physicochemical properties, *Biochim. Biophys. Acta*, **455**, 322—331 (1976).
28. Mueller P., Rudin D. O., Tien H. T., Wescott W. C., Methods for the formation of single bimolecular lipid membranes in aqueous solution, *J. Phys. Chem.*, **67**, 534—535 (1963).
29. Montal M., Mueller P., Formation of bimolecular membranes from lipid monolayers and a study of their electrical properties, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **69**, 3561—3566 (1972).
30. Verkleij A. J., Zwall R. F. A., Roelofsen B., Kastelijn D., van Deenen L. L. M., The asymmetric distribution of phospholipids in the human red cell membrane, *Biochim. Biophys. Acta*, **323**, 178—193 (1973).
31. Hub H. H., Zimmermann U., Ringsdorf H., Preparation of large and unilamellar vesicles, *FEBS Lett.*, **140**, 254—256 (1982).

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА

- Houslay M. D., Stanley K. K., *Dynamics of Biological Membranes*, J. Wiley & Sons, New York, 1982.
- Azzi A., Brodbeck U., Zahler P. (eds.), *Membrane Proteins, a laboratory manual*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1981.
- Coronado R., Labarca P. P., Reconstitution of single ion channel molecules, *TINS*, **7**, 155—160 (1984).
- Weissmann G., Clairborne R. (eds.), *Cell Membranes. Biochemistry, Cell Biology, and Pathology*, Hospital Practice Publishing Co., New York, 1975.
- См. также работы [2—4, 8, 14, 20, 24] в разд. «Цитированная литература».

ГЛАВА 4

МИЕЛИН

Значительная часть информации об общей структуре биомембран, которой мы сейчас располагаем, получена в ходе изучения специализированной мембраны нервной системы — миелина. Благодаря своей относительно простой структуре миелин использовался для разработки экспериментальных методов исследования мембран и построения их теоретических моделей. Миелин представляет собой многослойную систему, которая служит своеобразной изоляцией центральных и периферических нервных волокон. Белое вещество мозга у высших организмов более чем на 50% состоит из миелина, поэтому нарушения в образовании миелина при онтогенезе или изменения в структуре миелина в развитой нервной системе приводят к тяжелой невропатии. Следовательно, исследование структуры, функции и образования миелина представляется весьма важным для мембранологии и неврологии.

Функции миелина. 1. Изоляция; ускорение проведения импульса

Миелин покрывает аксон толстой оболочкой, предотвращающей электрические контакты между нервными волокнами в плотноупакованном пучке нервов (рис. 4.1). Изоляционные свойства оболочки обеспечиваются необычайно высоким по сравнению с другими мембранами содержанием липидов. Миелин выполняет и другие функции. Он повышает эффективность проведения нервного импульса двумя путями: путем увеличения проводимости и путем экономии энергии. Чтобы понять, каким образом миелин способствует увеличению проводимости, вспомним, что оболочка нервного волокна не непрерывна; она прерывается через равные промежутки (обычно через 1—2 мм) (рис. 4.1, б). Эти промежутки, по имени первооткрывателя, называются *перехватами Ранвье*, а участок между ними — *междоузлием* (в гл. 5 подробно рассмотрен механизм передачи сигнала по нервному волокну). С помощью электрофизиологических методов было обнаружено, что прохождение сигнала по миелинизированному волокну происходит не путем последова-

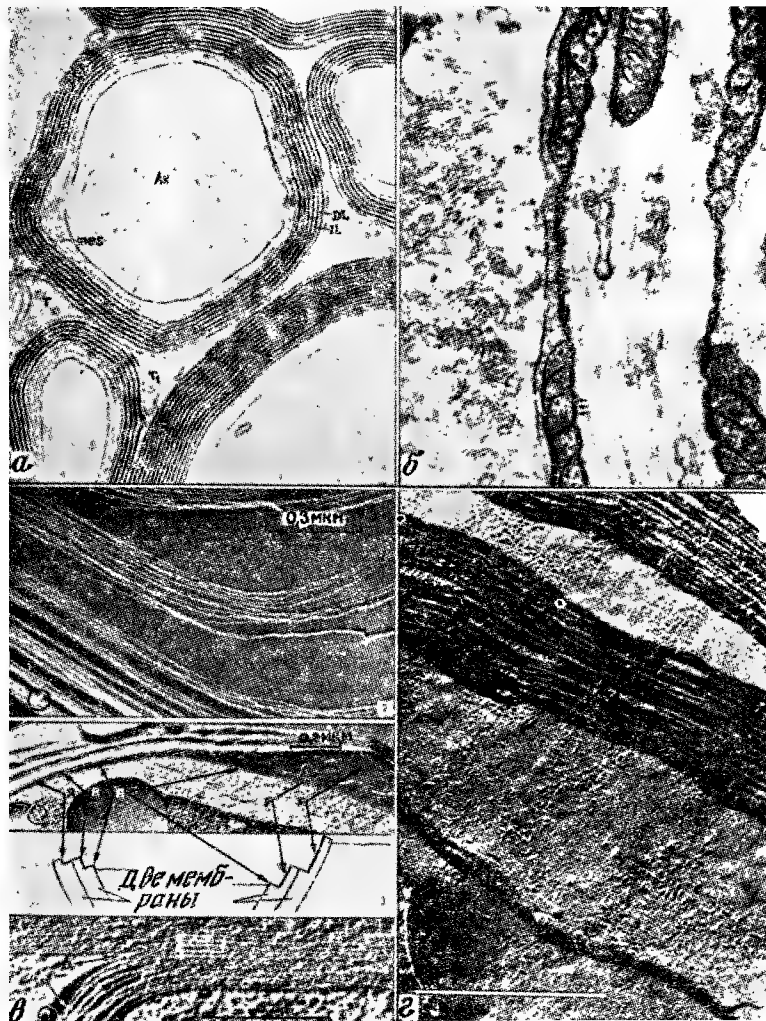


Рис. 4.1. Электронные микрофотографии. *а* — миелин. Сечение зрительного нерва крысы. Ax — аксон; mes — мезаксон, начало миелиновой спирали; DL — линия плотности клеточной мембраны, образованная цитоплазматической стороной глии, IL — внутренняя линия, образованная внешней стороной мембраны клетки (промежуточная область между двумя витками спирали); T — язычковое образование, внешнее окончание спирали. (Воспроизводится с разрешения.) [22]; *б* — перехват Ранвье в зрительном нерве крысы. AL — аксолема (мембрана аксона); D — «карманы», представляющие собой окончание миелиновой пленки; mt — митохондрии; *в* — препараты миелиновой оболочки при анализе методом замораживания — скалывания; *г* — сколы, выявляющие частицы, возможно белки, погруженные в миелиновый бислой. (Воспроизводится с разрешения Pinto da Silva.) [3]. *а* и *б* — негативное окрашивание; *в* и *г* — образец, полученный методом замораживания — скалывания.

тельного возбуждения одного за другим ионных каналов, а посредством скачков потенциала между перехватами Ранвье, т. е. на расстояние 1—2 мм, причем миелиновая оболочка междоузлий усиливает проведение сигнала (рис. 4.2, б).

Таким образом, в волокнах сравнимого диаметра достигается значительное ускорение передачи сигнала (в 5—10 раз). Скорость проведения импульса увеличивается с увеличением диаметра — в немиелинизированных волокнах она возрастает пропорционально квадрату диаметра волокна (так как электрическое сопротивление падает пропорционально квадрату радиуса), в миелинизированных волокнах соотношение находится в прямой пропорции. Преимущество миелинизации так велико, что если бы наш спинной мозг вместо миелинизированных состоял только из немиелинизированных волокон, он был подобен стволу дерева среднего размера. У позвоночных все нервные волокна миелинизированы, и импульс передается со скоростью >3 м/с.

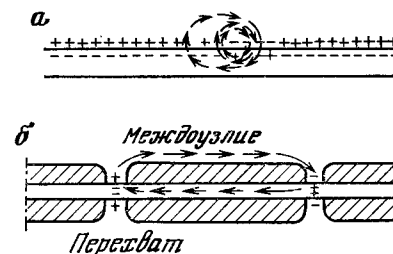


Рис. 4.2. Проведение нервного импульса в немиелинизированном (*а*) и миелинизированном (*б*) нервах (скачкообразная проводимость). Междоузлие представляет собой участок между двумя перехватами нервного волокна.

Функции миелина. 2. Экономия пространства и энергии

Беспозвоночные, за исключением речного рака, не имеют миелинизированных волокон. Однако встречаются начальные стадии миелинизации, когда аксоны покрываются несколькими слоями шванновской клетки — протомиелином. В ходе эволюции миелинизация волокон становится доминирующей. Важное преимущество, сопровождающее этот процесс, — достигаемая компактность всей системы. Такая экономия пространства гораздо в большей степени важна для головного мозга, чем для спинного мозга.

Речь идет не только о пространстве, которое экономит миелин. При передаче нервного импульса происходит проток ионов через ионные каналы, открываемые в ответ на деполя-

ризацию мембраны. Данный процесс стабилизируется и замедляется самой мембраной, которую при физическом подходе к системе можно рассматривать как своеобразную электрическую емкость (конденсатор). Чем значительнее емкость конденсатора, тем больше зарядов абсорбируется, до тех пор пока не достигается деполяризация, необходимая для генерации нервного импульса. В гл. 5 и 6 эти вопросы рассматриваются подробно, здесь же обратим внимание лишь на то, что миелинизация придает волокнам меньшую емкость. Поэтому для деполяризации

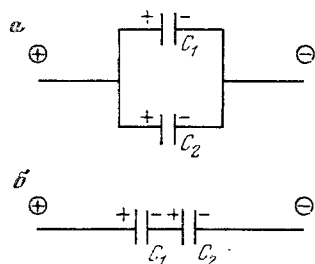


Рис. 4.3. Конденсаторы, соединенные параллельно (а) и последовательно (б). Схема б соответствует расположению в миелинизированном аксоне.

требуется меньшее количество абсорбированных зарядов, меньшее их количество потребуется также для достижения состояния покоя посредством откачки ионов (гл. 7) с использованием метаболической энергетической «кладовой» — АТР. В результате этого благодаря меньшей емкости для проведения сигнала миелинизированные волокна требуют меньше энергии, чем немиелинизированные.

Но почему емкость миелиновой оболочки меньше емкости мембраны простого аксона? Физика поможет найти объяснение: множество концентрических слоев миелина вокруг аксона представляют собой систему емкостей, соединенных в серию (рис. 4.3), а емкость такой системы меньше, чем емкость одного слоя.

Миелин — компактная спираль из плазматической мембраны

В 1954 г. Герен исследовала образование миелина вокруг седящего нерва эмбриона цыпленка [1]. Было установлено, что число слоев зависит от возраста эмбриона и что на ранних стадиях прослеживается спиральная структура. На рис. 4.4 приведены результаты, полученные Герен на периферическом нерве. Вероятно, подобная ситуация происходит при миелинизации волокон центральной нервной системы: аксон вызывает депрессию на поверхности шванновской клетки, которая начинает расти и образует спираль миелина вокруг него. Как было показано, на культуре ткани один виток завершается за 44 ч. Увеличение числа витков спирали приводит к сжатию цитоплазмы, в результате чего плазматическая мембрана шванновской клетки становится значительно более плотноупакованной. Поэтому зрелая миелиновая оболочка представляет собой не-

сколько слоев мембраны шванновской клетки, которая как бы намотана вокруг аксона. Каждое междоузлие образуется из одной такой клетки (в центральной нервной системе из олигодендроцитов). Несмотря на то что биохимия онтогенеза миелина пока еще не исследовалась, тем не менее параллельно морфологическому развитию наблюдаются молекулярные изменения, которые приводят к характерным особенностям состава мембраны миелина по сравнению с другими плазматическими мембранами, включая мембраны шванновской клетки (см. ниже).

Бислойная структура миелина

В науке миелин — это в некотором смысле архаизм. Мембранная модель Даниелли — Давсона, предложенная в 1934 г. (гл. 3), в настоящее время не подходит для большинства клеточных мембран, хотя ею вполне можно воспользоваться для миелина. Так, электронные микрофотографии Брентона [2], пожалуй, подтверждают, что структура мембраны миелина похожа на сэндвич: липидный слой внутри, а по краям слой белка (рис. 4.1, в). В зоне, соответствующей внутренней части бислоя, не удалось обнаружить частиц, напоминающих интегральные белки других плазматических мембран. Однако недавние электронно-микроскопические исследования, выполненные Пинто да Сильва и Миллером, подвергают сомнению данные Брентона: они идентифицировали частицы на внутренней стороне внутренней зоны бислоя (рис. 4.1, г [3]). Согласно данным других исследователей, ламеллярная структура миелина, вероятно, остается даже после экстракции 98% липидов [4].

Перед рассмотрением моделей подведем некоторые итоги: на электронной микрофотографии четко видна «регулярная единица», имеющая длину 17 нм и образованная двумя бислоями клеточной мембраны при одном витке спирали шванновской клетки. Рентгеноструктурные исследования (с разрешением 1 нм, рис. 4.5) позволили получить более подробную информацию [5]: толщина липидного бислоя составляет ~5 нм, а каждого белкового — ~1,5 нм, таким образом, толщина мембраны равна 8 нм. Электронная плотность внутренней части мембраны наименьшая, по направлению к внешней стороне она достигает максимума и затем опять уменьшается. Следовательно, можно сделать вывод, что в центральном слое толщиной 1,5 нм располагаются главным образом углеводородные цепи, затем гидрофильные группы липидов и, наконец, белки. Данные рентгеноструктурного анализа выявили асимметричное распределение электронной плотности, из чего можно заключить, что холестерин сконцентрирован на внешней стороне мембраны; другие

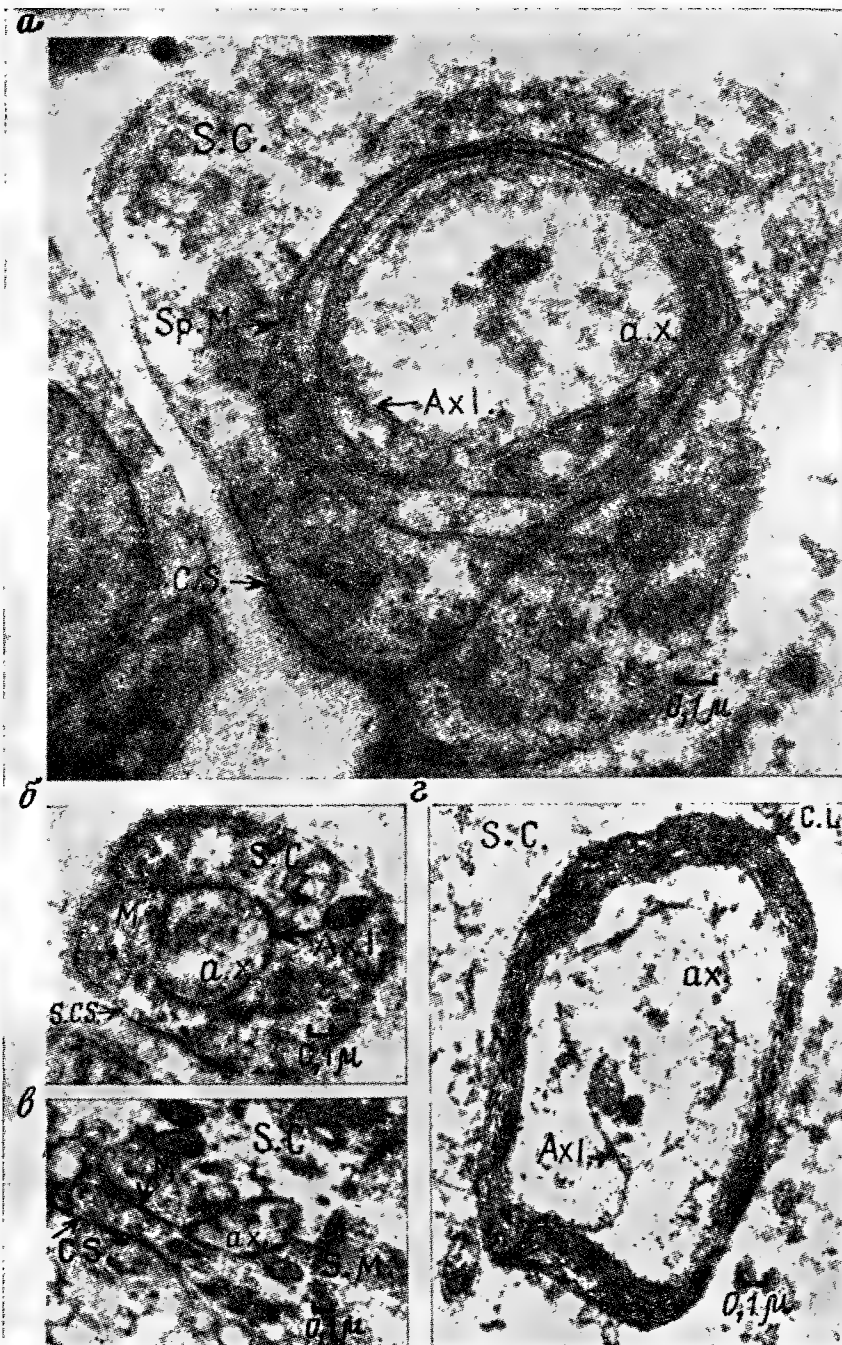


Рис. 4.4а. Образование миелиновой оболочки из шванновской клетки (электронные микрофотографии) [1].

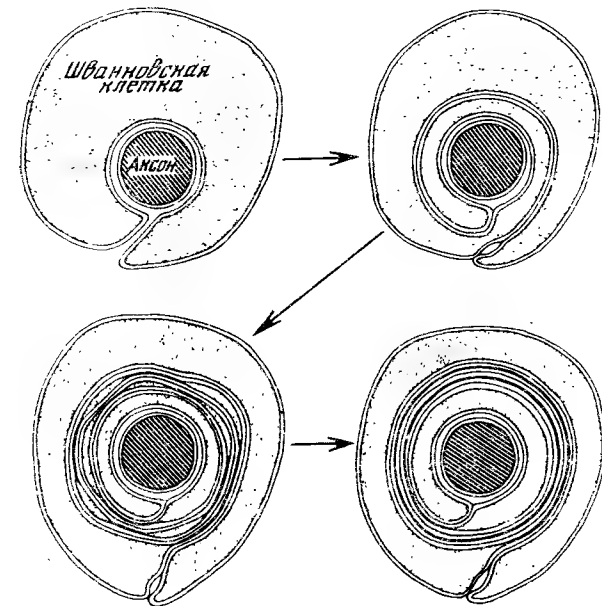


Рис. 4.4б. Схема образования миелиновой оболочки шванновской клетки.

липиды могут также распределяться асимметрично. Данная асимметрия миелиновой мембраны была позже подтверждена биохимическими экспериментами, на основании которых было показано, что в мозге морской свинки фосфатидилхолин сконцентрирован на внешней стороне мембраны [6]. Такое неравномерное распределение липидов между двумя слоями миелинового бислоя, возможно, возникает как следствие их различного сродства к мембранным белкам [7, 8], которые также расположены асимметрично (гл. 3).

Химический состав миелина

Модель на рис. 4.5, полученная методом рентгеновского рассеивания, включает некоторые результаты биохимического анализа миелина. Наиболее четко выделяются липиды, составляющие 70—85% сухой массы, т. е. по сравнению с другими плазматическими мембранами в миелине содержание липидов в ~2 раза выше [9, 10]. Липидов, специфических для миелина, как таковых, не существует; только кардиолипин, характерен для митохондриальной мембраны, все остальные липиды мие-

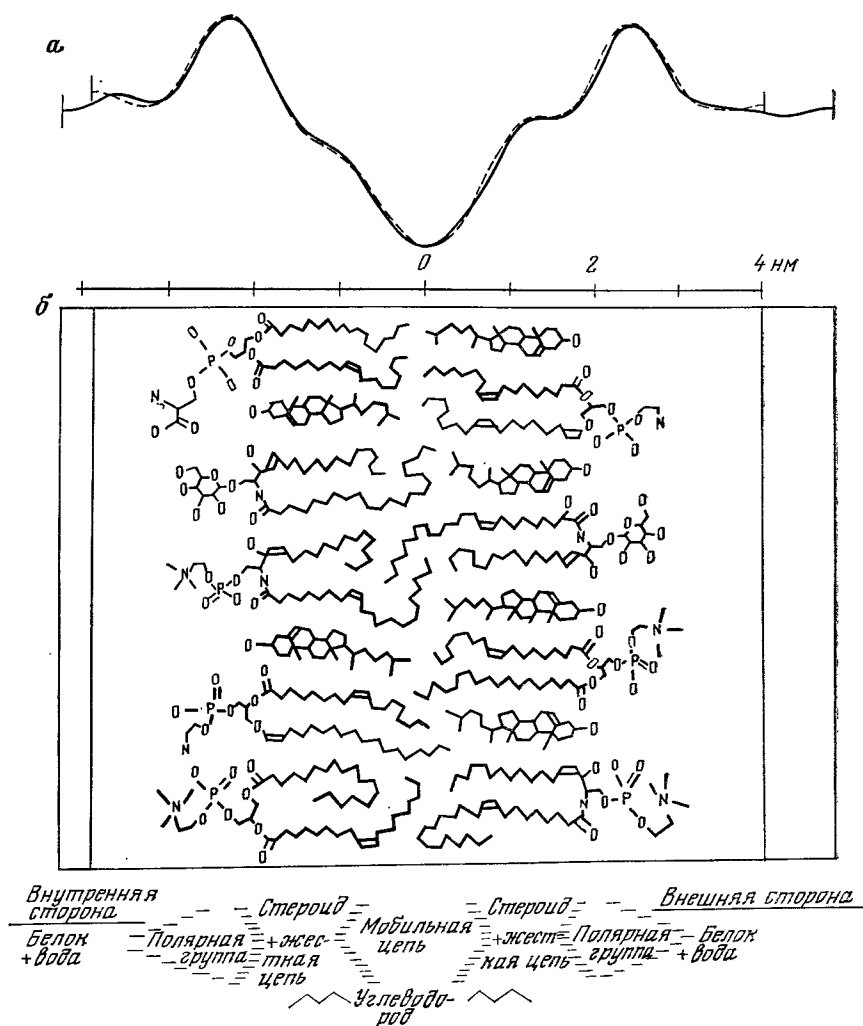


Рис. 4.5. а — распределение интенсивности в мембране миелина получено методом малоуглового рентгеновского рассеивания с разрешением 1 нм. Максимальная электронная плотность соответствует полярным липидным головкам; минимум — середине гидрофобных цепей бислоя. Более высокое плечо на правой (внешней) стороне, по-видимому, связано с повышенным содержанием холестерина на внешнем монослое; б — интерпретация модели. (Воспроизводится с разрешения Caspar and Macmillan Journals Ltd.) [5].

лина встречаются и в других плазматических мембранах. Но миелин заметно отличается от других мембран по количественному содержанию липидов (табл. 4.1 и 4.2). Следует отметить

Таблица 4.1. Состав миелина. Сравнение с мембраной эритроцита [10]

Компонент	Содержание, %	
	в миелине центральной нервной системы (бычий)	в мембране эритроцита
Белки (% общей массы)	25	63
Липиды (% общей массы)	75	37
Ферменты	Мало	Много
Липиды ^а		
Холестерин	28	28
Фосфолипиды	42	61
Цереброзиды	25	11
Цереброзид сульфата	5	0
Ганглиозиды	Следы	+

^а Содержание относительно суммарного липидной фракции.

высокое содержание цереброзида и пониженное количество ганглиозидов и фосфолипидов. Ганглиозиды почти полностью представлены G_{m1}. Для миелиновой мембраны типично также значительное содержание цереброзида, причем увеличение его количества во время развития центральной нервной системы эмбриона коррелирует с процессом миелинизации. И наоборот, содержание цереброзида оказывается явно меньше пропорционального, если в процессе миелинизации наблюдаются патологические или генетические нарушения. Мутантные мыши с генетическими нарушениями миелиновой оболочки (например, мутанты, в которых эти нарушения проявляются в виде «дрожания» или «подпрыгивания») содержат только 10% цереброзидов мозга нормальных мышей [11].

Обычно миелин получают гомогенизацией нервной ткани с последующим фракционированием посредством центрифугирования в градиенте плотности. Его плотность составляет 1,08 г/мл, что позволяет применять изопикнические методы. Данные анализа, полученные различными исследователями, отличаются; причиной могут быть примеси аксональной мембраны.

Следствием высокого содержания липидов является малый процент белка. Белковый состав относительно прост; в основном это протеолипид (35—50% общего содержания белка); кроме того, найдены основной белок (30%) и несколько кислых белков (эта группа белков называется белками Вольфграма), функция которых пока неизвестна.

В миелине обнаружено несколько видов ферментативной активности: холестеролэстеразы, 2',3'-сАМР-гидролизующей фосфодиэстеразы и сАМР-зависимой протеинкиназы, фосфори-

Таблица 4.2. Белковый и липидный состав миеллина различных организмов; сравнение белого вещества, содержащего преимущественно миелинизированные нервные волокна, с серым веществом, в котором содержатся тела нейронов [10]. Приведенные данные могут варьировать, поскольку цитируются результаты анализа, полученные в разных лабораториях

Компонент	Содержание, %						
	в миелине			в белом веществе		в сером веществе	в мозге крысы
	человека	быка	крысы	человека	быка	человека	
Белки ^a	30,0	24,7	29,5	39,0	39,6	55,3	56,9
Липиды ^a	70,0	75,3	54,9	54,9	55,0	32,7	37,0
Холестерин	27,7	28,1	27,3	27,5	23,6	22,0	23,0
Цереброзиды	22,7	24,0	23,7	19,8	22,5	5,4	14,6
Сульфатиды	3,8	3,6	7,1	5,4	5,0	1,7	4,8
Общие галактолипиды	27,5	29,3	31,5	26,4	28,6	7,3	21,3
Общие фосфолипиды	43,1	43,0	44,0	45,9	46,3	69,5	57,6
Лецитин	11,2	10,9	11,3	12,8	12,9	26,7	22,0
Сфингомиелин	7,9	7,1	3,2	7,7	6,7	6,9	3,8
Фосфатидилсерин	4,8	6,5	7,0	7,9	11,4	8,7	7,2
Фосфатидилинозит	0,6	0,8	1,2	0,9	0,9	2,7	2,4
Плазмалогены	12,3	14,1	14,1	11,2	12,2	8,8	11,6

^a Приведено общее содержание относительно сухой массы.

лирующей основной белок. Кроме того, идентифицирована фосфатаза, активная главным образом в цитозоле, и в дополнение к холестеролэстеразе в миелине центральной нервной системы крысы обнаружена холестеролацетилтрансфераза [12a]. Были также найдены сфингомиелиназа [13] и карбоангидраза. Фосфодиэстераза очищена, и ее некоторые ферментативные свойства охарактеризованы [14]. Тот факт, что активность фосфодиэстеразы в связи с нарушением миелинизации в мозге мутантной мыши явно снижается, подтверждает принадлежность этого фермента миелину [15]. При исследовании субстратной специфичности установлено, что галактозилцереброзид и фосфатидилсерин активируют активность холестеролэстеразы, а ганглиозид и лизолецитин, наоборот, ингибируют ее. Четкие физиологические функции ферментов миелиновой оболочки пока еще не обнаружены.

Таблица 4.3. Ферментативная активность миелиновой мембраны

Фермент	Животное	Литература
2'3'-Циклонуклеотид-2-фосфодиэстераза (КФ 3.1.4.16)	Бык (белое вещество)	14
Киназа (А1-фосфорилирующая)	Крыса (белое вещество)	25
Фосфатаза (А1-дефосфорилирующая)	Крыса (ЦНС)	25
Сфингомиелиназа (КФ 3.1.4.12)	»	13
Холестеролэстераза (КФ 3.1.1.13)	»	26
Холестеролацетилтрансфераза (КФ 2.3.1.26)	»	12a
Карбоангидраза (КФ 4.2.1.1)	»	27

Миелин целиком не метаболизирует

Тот факт, что миелин содержит мало цитоплазмы, а также то, что он имеет пятьдесят или более плотноупакованных слоев мембраны, позволяет ему обладать значительной стабильностью, т. е. малой скоростью метаболического разложения, которая заметно ниже, чем у других плазматических мембран. Период полуразложения липидов колеблется от 5 нед (фосфатидилинозит) до 2—4 мес (фосфатидилхолин и фосфатидилсерин) или до года (фосфатидилэтанолламин, холестерин, цереброзид, сульфатид и сфингомиелин). Для белков этот период колеблется в пределах 2—6 нед (основной белок и протеолипид). Значительно более интересно то обстоятельство, что период полуразложения различен для каждого компонента мембраны, и, следовательно, они обновляются независимо друг от друга. Таким образом, миелин как целая единица не метаболизируется. Более того, ни его внешний слой, ни ближайший к аксоплазме слой не заменяются новыми. Опыты с радиоактивными предшественниками липидов показывают, что обмен происходит между всеми слоями.

Белки с неизвестной функцией

В 1951 г. Фолч-Пи, экстрагируя миелин из мозга смесью хлороформ — метанол (2:1), выделил белковую фракцию [16]. С этого времени белки, полученные таким способом, обычно классифицируются как *протеолипиды*. Вопреки ожиданию белок, полученный по способу Фолч-Пи и содержащий 2—3% ковалентно связанных липидов, оказался гетерогенным. Кроме основной фракции протеолипидов с *M* 23 500 были охарактери-

зованы два других липофильных белка: один с M 20 500 (этот белок иногда называют DM-20) и другой с M 12 000 (P-12). Протеолипид содержит >50% гидрофобных аминокислотных остатков, в смеси хлороформ — метанол он существует в α -спиральной и мономерной форме, но в воде агрегирует с потерей своей спиральной структуры. Поскольку в модельных экспериментах протеолипид осуществляет разделение липидной фазы и преимущественно связывает кислые липиды [7], он частично обуславливает отмеченную выше асимметрию миелиновой мембраны. Полученные с использованием метода замораживания — скалывание фотографии миелина [3], а также искусственных липосом со встроенным протеолипидом [17] показывают, что это интегральный белок, погруженный в липидную фазу мембраны.

Вторая белковая фракция, названная в честь ее первооткрывателя белком Вольфграма, характерна тем, что растворяется в подкисленной соляной кислотой смеси хлороформа и метанола. Она имеет большую молекулярную массу и составляет 20% белка миелина. В отличие от белка Фолч-Пи данный белок гидролизует трипсином и состоит по крайней мере из трех компонентов.

Белки миелина, которые мы рассматривали, представляют собой основные белки. Было обнаружено, что после их введения развиваются симптомы, схожие с симптомами рассеянного склероза [18]. Проявление этих симптомов получило название экспериментальный аллергический энцефаломиелит, о котором пойдет речь в последующих главах. Основной белок миелина, называемый также A1-белком, экстрагируется буфером высокой ионной силы со слабощелочным pH; он составляет ~30% белка миелина и имеет M 18000; на рис. 4.6 изображена его первичная структура. Вероятно, он имеет слабовыраженную вторичную и третичную структуры. Его изоэлектрическая точка равна 10, что указывает на высокое содержание остатков аргинина и лизина, которые равномерно рассредоточены по белку. В результате вся молекула взаимодействует с кислотными группами мембранных липидов.

Измерения вязкости дают осевое соотношение 10:1, это свидетельствует о сильно вытянутой форме белка. Интересно, что его антигенные свойства сохраняются при нагревании до 95 °C в течение 1 ч. Результаты измерения дисперсии оптического вращения (ДОВ) не выявляют спиральной структуры белка.

У A1-белка, однако, не полностью отсутствует третичная структура [9]. Четыре остатка пролина (в положениях 96 и 99—101) складывают белковый остов в параллельные цепи; этот процесс не стабилизируется дисульфидным мостиком (A1

не содержит Cys-остатков), но, возможно, поддерживается специфическими химическими взаимодействиями белка. В положении 107 располагается остаток аргинина, который после метилирования боковой цепи становится гидрофобным. Согласно модели (рис. 4.7), в петле, образованной четырьмя остатками пролина, метильные группы расположены напротив двух остатков фенилаланина (Phe-89 и Phe-90). Эйлар [9] считает, что гидрофобное взаимодействие в этой области стабилизирует структуру.

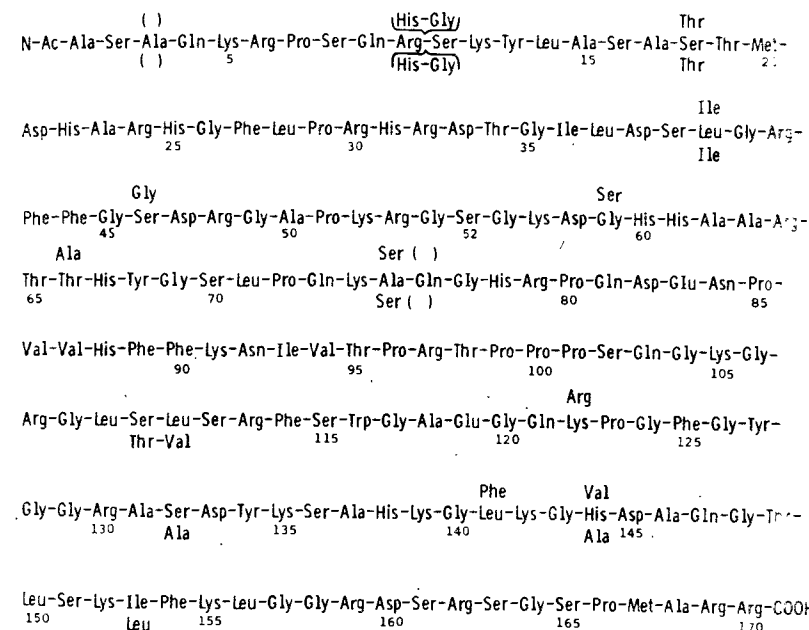


Рис. 4.6. Первичная структура белка A1 миелина (основной белок миелина). Представлена последовательность белка быка; замены сверху — для белка человека, внизу — для белка кролика.

Гидрофобные последовательности, например в положении 86—90, могут взаимодействовать с гидрофобными участками мембраны (рис. 4.8). Одна энцефалитогенная детерминанта представляет собой пептид, локализованный вокруг остатка триптофана в положении 116. С помощью пептидного синтеза было показано, что существенную роль для генезиса симптомов играет последовательность — Trp---Gln-Lys(Arg) [19, 20].

Белковый состав миелина периферической и центральной нервной системы различен. У миелина периферической нервной системы протеолипид просто отсутствует, A1 присутствует, но

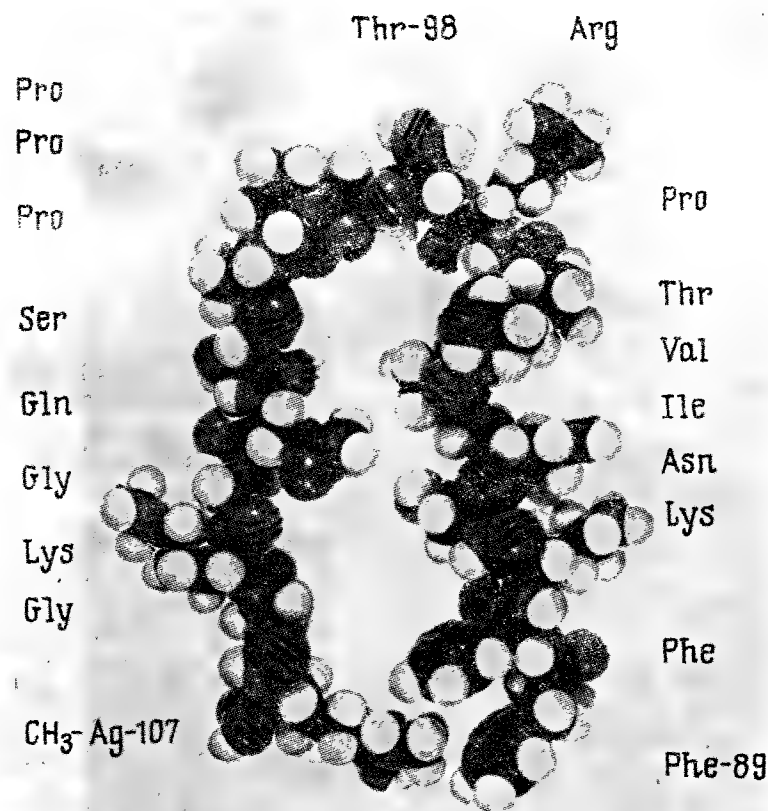


Рис. 4.7. Пространственная атомная модель участка основного белка A1 с энцефалитогенными детерминантами. Представлена последовательность от Phe-89 (справа) до метил-Ag-107 (слева) (см. текст).

основная часть состоит из другого основного белка P0. Последний не растворяется в воде и органических растворителях и обладает $M 30\,000$. Другой основной белок P2 ($M 12\,000$), по-видимому, несет энцефалитогенную детерминанту (см. ниже). У различных организмов число данных белков в периферической нервной системе непостоянно.

Экспериментальная аутоиммунная болезнь: модель рассеянного склероза?

Аутоиммунные болезни — следствие нарушения механизма, посредством которого иммунная система отличает «своего» от «чужого». В качестве двух классических примеров можно привести *миастению* (гл. 9) и *рассеянный склероз*. Ни для одного из этих заболеваний этиология в деталях неизвестна. Однако в настоящее время появилась возможность моделировать эти заболевания, т. е. экспериментальным путем вызывать у животных основные симптомы болезней. Основной причиной рассеянного склероза является демиелинизация с последующим на-

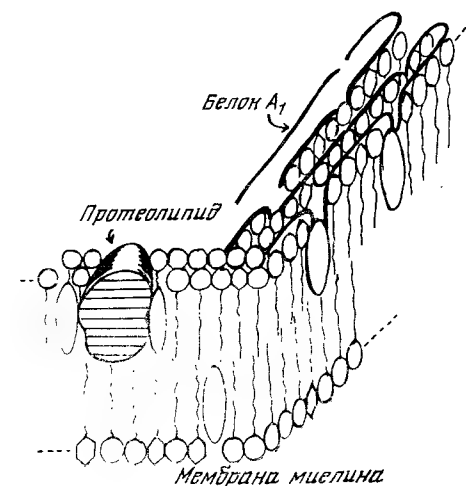


Рис. 4.8. Модель мембраны миелина по Эйлару. Основной белок A1 взаимодействует с полярными липидными головками, стабилизируя мембрану в горизонтальном положении. Гидрофобная область A1 дополнительно фиксирует липидную фазу мембраны [9]. (Воспроизводится с разрешения Raven Press, New York, 1980.)

рушением нервной функции. Те же симптомы наблюдаются, если ткань мозга, суспендированная в адьюванте Фрейнда, вводится в ЦНС животного. Исследования компонентов миелина позволили установить, что белок A1 при введении в дозе < 5 мкг вызывает паралич и смерть морских свинок. При воздействии на центральную нервную систему белок, вероятно, сенсибилизирует иммунную систему и приводит к *экспериментальному аллергическому энцефаломиелииту* (ЭАЭ). Это соответствует *экспериментальному аллергическому невриту* (ЭАН) периферических нервов. В данном случае белок P2 выполняет роль своеобразного фактора запуска. A1 периферического мие-

лиа, введенный в центральную нервную систему, вызывает ЭАЭ, тогда как введение всего миелина периферического нерва никакого действия на мозг не оказывает. В этом интактном миелине периферического нерва антигенная детерминанта, по-видимому, замаскирована. Доказано, что причина болезни заключается в сенсibilизации Т-системы, а не антитела к белку.

Неясно, почему А1 (или Р2) вызывает заболевание; более того, почему симптомы проявляются на относительно малом участке пораженного организма? Предполагают [20], что причина, вероятно, связана со структурной аналогией между триптофаном в положении 116 на А1 (см. выше) и нейромедиатором серотонином (5-гидрокситриптамиином); ЭАЭ, таким образом, возникает как иммунный ответ на рецептор серотонина, препятствующий нормальному действию серотонина в качестве нейромедиатора в специфических областях центральной нервной системы. Если данное предположение удастся доказать, то, возможно, это будет первый шаг к хемотерапии заболевания.

Болезни, обусловленные дефектами миелина

Многочисленные невропатии вызывают нарушение миелиновой оболочки. Инфекции, генетические нарушения метаболизма, интоксикация или режим питания — факторы, которые могут спровоцировать болезнь. Хотя это еще не доказано, но предполагают, что рассеянный склероз и аналогичное заболевание периферической нервной системы, синдром Ландри — Гуилляна — Барре, вызывается вирусом. Вероятно, природа многих дегенеративных заболеваний центральной нервной системы также вирусная: это так называемые *медленные вирусные инфекции*. Вирусная инфекция вызывает такие смертельные заболевания, как *болезнь Крейцфельд — Жакоба* и *куру*, распространенные среди охотников за головами в Новой Гвинее. Женщины и дети племени папуасов заражаются болезнью куру во время приготовления ритуального кушанья из мозга человека [23]. Вирусы куру ведут себя столь необычно, что трудно поверить в то, что это действительно вирусы. Они меньше всех известных вирусов, устойчивы к протеазам, нуклеазам, к нагреванию (80 °С), формальдегиду, воздействию ультрафиолета (254 нм) и ультразвуку. Они не проявляют антигенных свойств. Куру на языке папуасов означает «дрожащий», что характеризует основные симптомы заболевания. У животных аналогом болезни мозга человека является «почесуха» (расцарапывание), наблюдаемая у овец; эта болезнь служит своеобразной моделью для исследований данной группы заболеваний [24].

Мы уже рассматривали генетически обусловленные болезни, связанные с изменением миелина — сфинголипидозы (гл 2).

Примерами данной группы заболеваний могут служить *метахроматическая лейкодистрофия* и *лейкодистрофия Креббе*; при этих заболеваниях вследствие наследственного нарушения образования отдельных гликолипидов наблюдается их накопление. Название «лейкодистрофия» означает дегенерацию белого вещества. Кроме перечисленных заболеваний, вызванных демиелинизацией, существует другая группа, у которой нарушение миелиновой оболочки — это одна из причин болезни, возможно, не самая главная, например *фенилкетонурия*, при которой также происходит нарушение миелинизации, но в результате накопления фенилпировиноградной кислоты. Причина болезни — дефект фенилаланингидроксилазы, в результате чего блокируется нормальный метаболизм фенилаланина.

Интересной моделью для исследования генетически обусловленных нарушений метаболизма миелина послужили мутантные мыши, о которых выше уже шла речь.

Токсичные вещества и факторы питания, способные вызывать болезни, связанные с демиелинизацией, могут иметь самую разнообразную природу: это может быть дифтерийный токсин, гексахлорофен или свинец. Голодание ведет к нарушению миелинизации, особенно в определенные критические периоды развития центральной нервной системы. У человека это бывает в первый год жизни, так как при рождении процесс миелинизации центральной нервной системы еще не закончен.

Выводы

Миелиновая оболочка — это мультиламеллярная структура, созданная мембранами олигодендроглий (ЦНС) или шванновских клеток (ПНС). Ее основные функции заключаются в изоляции аксона, ускорении проведения нервного импульса (скачкообразная проводимость) и сохранении ионных потоков путем сокращения емкости мембраны. В результате экономится энергия, поскольку меньшее число ионов необходимо откачать из аксона после деполяризации мембраны. Миелин экономит также пространство, так как при одинаковой проводимости миелинизированные волокна тоньше, чем немиелинизированные. Миелин появляется на поздних стадиях филогенеза и онтогенеза.

Строение миелина в некоторой степени соответствует мембранной модели Даниелли — Брентона; но в настоящий момент известно, что белок погружен также в липидную фазу мембраны (Пинто да Сильва и Миллер). Мембрана миелина асимметрична (фосфатидилхолин), и холестерин располагается в основном на внешней стороне. В ее составе 75% приходится на липиды (типичен галактозилцеребозид), среди которых 28% составляет холестерин. Липиды миелина обновляются сравнительно медленно.

Таблица 4.4. Три белка, содержащиеся в миелине ЦНС и характеризующиеся различной растворимостью

Характеристика	Протеолипид	Основной белок А1	Белок Вольф-грама
Растворимость	Органические растворители	Слабые кислоты	Органические растворители
Молекулярная масса	25 000, гетерогенный	18 000	Большая, гетерогенный
Содержание относительно общей массы белка, %	30—50	30	20
Структура	50% — неполярные аминокислоты; 2% — жирные ковалентно связанные кислоты	Данных о вторичной или третичной структуре нет, энцефалогенин (ЭАЭ)	

Среди белков миелина идентифицированы три фермента с неизвестной функцией (2,3-сАМР-фосфодиэстераза, холестеролэстераза и протеинкиназа). Миелин центральной нервной системы содержит три белка, отличающиеся по растворимости (табл. 4.4).

В миелине периферической нервной системы, помимо основного белка Р2, найден белок А1. Главный компонент — белок Р0, нерастворимый в воде и органических растворителях (M 30 000). Белок А1 вызывает ЭАЭ (модель рассеянного склероза); белок Р2 провоцирует ЭАН.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Geren B. B., The formation from the Schwann cell surface of myelin in the peripheral nerves of chick embryos, *Exp. Cell Res.*, **7**, 558—562 (1954).
2. Branton D., Fracture faces of frozen myelin, *Exp. Cell Res.*, **45**, 703—707 (1967).
3. Pinto da Silva P., Miller R. G., Membrane particles on fracture faces of frozen myelin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 4046—4050 (1975).
4. Hapolitano L., LeBaron F., Scaletti J., Preservation of myelin lamellar structure in the absence of lipid. A correlated chemical and morphological study, *J. Cell Biol.*, **34**, 817—826 (1967).
5. Caspar D. L., Kirschner D. A., Myelin membrane structure at 1 nm resolution, *Nature New York Biol.*, **231**, 46—52 (1971).
6. Brammer M. J., Sheltawy A., The role of lipids in the observed lack of phosphatidylcholine exchange in myelin, *J. Neurochem.*, **27**, 937—942 (1976).
7. Boggs J. M., Wood D. D., Moscarello M. A., Papahadjopoulos D., Lipid phase separation induced by hydrophobic protein in phosphatidylserine-phosphatidylcholine vesicles, *Biochemistry*, **16**, 2325—2329 (1977).
8. Boggs J. M., Moscarello M. A., Papahadjopoulos D., Phase separation of acidic and neutral phospholipids induced by human myelin basic protein, *Biochemistry*, **16**, 5420—5426 (1977).
9. Eylar E. H., Myelin-specific proteins. In: *Proteins of the Nervous System*. Schneider D. J. (ed.), 3rd edition, Raven Press, New York, 1976.

10. Norton W. T., Formation, structure, and biochemistry of myelin. In: *Basic Neurochemistry*, Siegel G. J., Albers R. W., Agranoff B. W., Katzman R. (eds.), 3rd edition, p. 63—92, Little Brown and Co., Boston, 1981.
11. Hogan E. L., Joseph K. G., Composition of cerebral lipids in murine leukodystrophy: the quaking mutant, *J. Neurochem.*, **17**, 1209—1214 (1970).
12. McNamara J. O., Appel S. H., Myelin basic protein phosphatase activity in rat brain, *J. Neurochem.*, **29**, 27—35 (1977).
- 12a. Choi M. U., Suzuki K., A cholesterol-esterifying enzyme in rat central nervous system myelin, *J. Neurochem.*, **31**, 870—885 (1978).
13. Yamaguchi S., Suzuki K., A novel, magnesium-independent neutral sphingomyelinase associated with rat central nervous system myelin, *J. Biol. Chem.*, **253**, 4090—4092 (1978).
14. Glapshaw P. A., Müller H. W., Seifert W., Characterization of 2',3'-CNPase: Rapid isolation, native enzyme analysis, identification of a serum soluble activity, and kinetics, *J. Neurochem.*, **36**, 1996—2003 (1981).
15. Kurihara T., Nussbaum J. L., Mandel P., 2',3'-cyclic nucleotide 3-phosphohydrolase in brain of mutant mice with deficient myelination, *J. Neurochem.*, **17**, 993—997 (1970).
16. Folch-Pi J., Proteolipids. In: *Proteins of the Nervous System*, Schneider D. J. (ed.), p. 45—66, Raven Press, New York, 1973.
17. Boggs J. M., Moscarello M. A., Structural organization of the human myelin membrane, *Biochim. Biophys. Acta*, **515**, 1—12 (1978).
18. Kies M., Immunology of Myelin Basic Proteins. In: *The Nervous System*, D. B. Tower (ed.), Vol. 1, p. 637—646, Raven Press, New York, 1975.
19. Westall F. C., Robinson A. B., Cacam J., Jackson J., Eylar E. H., Essential chemical requirements for induction of allergic encephalomyelitis, *Nature*, **229**, 22—24 (1971).
20. McKhann G. M., Multiple sclerosis, *Ann. Rev. Neurosci.*, **5**, 219—240 (1982).
21. Brostoff S. W., Karkhanis Y. D., Carlo D. J., Reuter M., Eylar E. H., Isolation and partial characterization of the major proteins of rabbit sciatic nerve myelin, *Brain Res.*, **86**, 449—458 (1975).
22. Peters A., Palay S. L., Webster H. F.: *The Fine Structure of the Nervous System*. Harper and Row, New York, 1970.
23. Gadjusek D. C., Unconventional viruses and the origin and disappearance of Kuru, *Science*, **197**, 943—960 (1977).
24. Prusiner S. B., Novel proteinaceous infectious particles cause Scrapie, *Science*, **216**, 136—144 (1982).
25. Carnegie P. R., Dunkley P. R., Kemp B. E., Murray A. W., In vitro and in vivo phosphorylation of myelin basic protein by cerebral protein kinase, *Nature*, **249**, 147—149 (1974).
26. Eto Y., Suzuki K., Cholesterol ester metabolism in rat brain: A cholesterol ester hydrolase specifically localized in the myelin sheath, *J. Biol. Chem.*, **248**, 1986—1991 (1973).
27. Sapirstein V. S., Lees M. B., Purification of myelin carbonic anhydrase, *J. Neurochem.*, **31**, 505—511 (1978).

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА

- Norton W. T., Formation, structure, and biochemistry of myelin. In: *Basic Neurochemistry*, Siegel G. J., Albers R. W., Agranoff B. W., Katzman R. (eds.), 3rd edition, p. 63—92, Little Brown and Co., Boston, 1981.
- Lees M. B., Sapirstein V. S., Myelin-associated enzymes. In: *Handbook of Neurochemistry*, Vol. 4, Lajtha A. (ed.), 2nd edition, Plenum Press, New York, 1983.
- Chang D. C., Tasaki J., Adelman W. J., Leuchtag H. R. (eds.), *Structure and Function in Excitable Cells*, Plenum Press, New York and London, 1983.
- Morell P. (ed.), *Myelin*, 2nd edition, Plenum Press, New York and London, 1984.

См. также работы [20, 24] в разд. «Цитированная литература».

ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЯ

Нервные клетки передают сигналы в виде электрических импульсов на значительные расстояния со скоростью несколько сотен метров в секунду. Для понимания химических основ функции нерва необходимо знание электрических свойств нейрона, изучением которых занимается электрофизиология. Для систематического и детального изучения проблем электрофизиологии следует обратиться к обзорам [1—2], в них специалисты смогут найти нужную информацию.

Нервная клетка осциллирует между двумя состояниями: покоя и возбуждения. Рассмотрим сначала электрические свойства клетки в состоянии покоя, затем обсудим изменения этих свойств в состоянии возбуждения.

Потенциал покоя

С начала века уже известно, что между внешней и внутренней поверхностью мембраны клетки устанавливается разность электрических потенциалов (рис. 5.1). Бернштейн впервые назвал его мембранным потенциалом, возникающим в связи с неравномерным распределением ионов на внешней и внутренней стороне клетки. Более подробному описанию этого явления способствовали две методологические «находки»: в 1936 г. Янг открыл гигантский аксон кальмара, который стал своеобразным даром для работающих в области электрофизиологии, а в 1946 г. Грехам и Геранд усовершенствовали микроэлектрод — стеклянную трубочку (диаметр < 1 мкм), заполненную концентрированным раствором электролита и вводимую в клетку без ее повреждения (рис. 5.1, а). Преимущество гигантского аксона кальмара связано с его размерами. Диаметр аксона равен 0,5 мм, поэтому, как показали Хождкин и Хаксли в 1939 г., тонкий электрод может быть введен в аксоплазму (рис. 5.1, б). С помощью данной методики стало возможным регистрировать как мембранный потенциал клетки, так и его изменения, происходящие при ее возбуждении. Гигантский аксон может быть освобожден от аксоплазмы посредством выдавливания. Затем в ходе его перфузии искусственным солевым раствором опре-

деленного состава могут быть исследованы изменения, связанные с возбуждением независимо от метаболических процессов в цитоплазме. Рассмотрим кратко наиболее важные результаты этих экспериментов.

Микроэлектрод, введенный в клетку, регистрирует по отношению к внешней среде мембранный потенциал ~ -70 мВ (рис. 5.1). Этот так называемый «потенциал покоя» типичен не только для нервных клеток, он наблюдается в различных клетках, например в одноклеточном организме *Paramecium* и эритроцитах. В мышечных клетках он достигает -90 мВ.

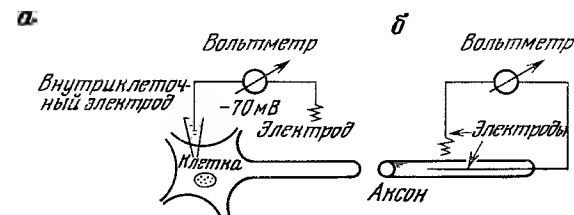


Рис. 5.1. Регистрация мембранного потенциала нервной клетки. а — путем введения внутриклеточного (микро)электрода; б — путем введения электрода внутрь аксона (возможно, только при очень большом диаметре аксона, например в случае гигантского аксона кальмара).

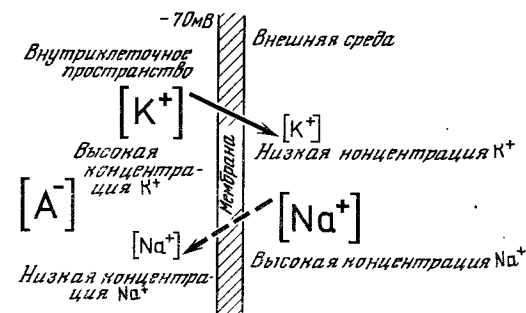


Рис. 5.2. Распределение ионов у мембраны нерва. Стрелки указывают на соответствующие ионные градиенты, наклон стрелок характеризует проницаемость мембраны. $[A^-]$ — анионы.

Какова природа возникновения потенциала покоя? Мембрана клетки выполняет роль эффективного барьера на пути ионов, и ее проницаемость различна для различных ионов (рис. 5.2). Так, она практически непроницаема для ионов натрия, но пропускает ионы калия, которые поэтому главным образом и обуславливают потенциал покоя. Концентрация ионов внутри клетки, например в гигантском аксоне кальмара, в 20 раз выше, чем снаружи (табл. 5.1). Их положительные за-

Таблица 5.1. Ионы аксоплазмы и крови кальмара. Внеклеточная концентрация ионов (кровь) практически равна ионной концентрации морской воды, которая обычно используется как внешняя среда в экспериментах с гигантскими аксонами кальмаров

Ион	Концентрация, ммоль/л		Отношение $[i_{in}]/[i_{out}]$
	Внутриклеточная	Внеклеточная	
K ⁺	400	20	20:1
Na ⁺	50	440	1:9
Cl ⁻	50	550	1:11
Органические анионы	350	—	—
Ca ²⁺	0,4	10	1:25

ряды компенсируются неспособными проникнуть через мембрану отрицательными противоионами, а именно белковыми полианионами, фосфатами и изетионатом $(HO-CH_2-CH_2-SO_3)^-$ (рис. 5.2). Благодаря наличию градиента концентрации скорость диффузии ионов калия из клетки выше, чем в клетку. При этом оставшиеся в клетке анионы, для которых мембрана непроницаема, создают суммарный отрицательный заряд. Этот процесс продолжается до тех пор, пока возникший на внутренней стороне мембраны отрицательный заряд не начинает сдерживать диффундирующие из клетки положительно заряженные ионы калия. Вскоре достигается такое состояние, при котором число ионов калия, проходящих через мембрану в обоих направлениях, становится одинаковым. Это состояние характеризуется равновесием сил: во-первых, создаваемых градиентом осмотической концентрации, который стремится к выравниванию концентрации ионов внутри и снаружи клетки и выводит ионы калия, и, во-вторых, электростатических сил, притягивающих ионы калия внутрь клетки. Для каждого значения градиента концентрации, т. е. соотношения $[K^+_{out}/K^+_{in}]$, соответствует равновесный электростатический потенциал, определяемый уравнением Нернста:

$$E_{K^+} = \frac{RT}{nF} \ln \frac{[K^+_{out}]}{[K^+_{in}]}$$

или, если подставить численное значение множителя $\frac{RT}{nF}$ (при 20°C) и перейти к десятичным логарифмам, то

$$E_{K^+} = 58 \lg \frac{[K^+_{out}]}{[K^+_{in}]}$$

где E_{K^+} — потенциал (в милливольтгах) между внутренней и внешней стороной мембраны, необходимый для уравнивания

ния потока ионов калия внутрь так, чтобы суммарный ток ионов через мембрану был равен нулю. Подставив значение $[K^+_{out}]/[K^+_{in}] = 1/20$ для гигантского аксона кальмара (табл. 5.1), получим $E_{K^+} = -75$ мВ.

Однако экспериментально было зарегистрировано значение только -70 мВ. Чем вызвано такое расхождение? До сих пор мы считали, что мембрана пропускает только K⁺, но не пропускает Na⁺. Но в действительности мембрана в некоторой степени проницаема и для Na⁺, а так как для концентрации Na⁺ характерен противоположный градиент по сравнению с градиентом концентрации K⁺, поток ионов натрия в противоположном потоку ионов калия направлении уменьшает измеряемый потенциал мембраны (такое явление называется «потоком покоя» для отличия от натриевого потока при возбуждении мембраны) (рис. 5.2). Это достаточно просто доказать экспериментально: если Na⁺ заменить на объемный ион, например холин $[(CH_3)_3N-CH_2-CH_2OH]^+$, то мембранный потенциал окажется равным -75 мВ, т. е. устанавливается теоретическое значение калиевого равновесного потенциала, так как ион холина не проникает через мембрану из-за своих размеров.

На рис. 5.3 показано, что мембранный потенциал гигантского аксона кальмара почти полностью обусловлен равновесным потенциалом K⁺: если внеклеточная концентрация ионов калия меняется, то изменяется потенциал покоя в соответствии с уравнением Нернста. Десятикратное изменение $[K^+_{out}]$ приводит к изменению значения E_{K^+} на 58 мВ ($\lg 10 = 1$), только при низких концентрациях K⁺ существенны отклонения от этой величины, т. е. нельзя игнорировать «поток покоя» ионов натрия.

Кроме K⁺, ионы Cl⁻ тоже могут диффундировать через мембрану. Их концентрация определяется мембранным потенциалом, т. е. соотношением $[Cl^-_{out}]/[Cl^-_{in}]$. Следовательно, для полного описания мембранного потенциала необходимо принимать во внимание изменение концентраций ионов хлора, а также натрия и калия.

Поскольку проницаемость мембраны для ионов Cl⁻, Na⁺ и K⁺ различна, в уравнение Нернста нельзя просто подставить их

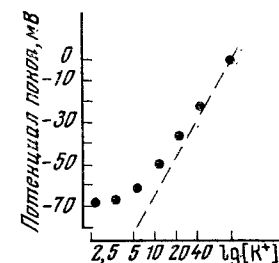


Рис. 5.3. Взаимосвязь между потенциалом покоя нервной клетки и наружной концентрацией K⁺ (ммоль/л). Отклонение точек от прямой при низких концентрациях свидетельствует о том, что потенциал покоя имеет не чисто калиевую природу и что ионы Na⁺ тоже участвуют в создании потенциала Нернста.

концентрации внутри и снаружи клетки, соответствующее значение для каждого иона надо умножить на коэффициент проницаемости P_{Na} , P_{Cl} , P_K . Тогда мембранный потенциал E_m определится формулой

$$E_m = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K[K^+_{out}] + P_{Na}[Na^+_{out}] + P_{Cl}[Cl^-_{in}]}{P_K[K^+_{in}] + P_{Na}[Na^+_{in}] + P_{Cl}[Cl^-_{out}]}$$

Это так называемое уравнение Гольдмана сводится к уравнению Нернста при условии, что рассматривается только один ион. Мембранный потенциал нейрона практически эквивалентен K^+ -потенциалу, поскольку проницаемость мембраны по Na^+ в состоянии покоя низкая, а ионы хлора, хотя они и распределяются через мембрану по калиевому потенциалу, обладают высокой проницаемостью и противоположным зарядом и, таким образом, не участвуют в создании суммарного мембранного потенциала.

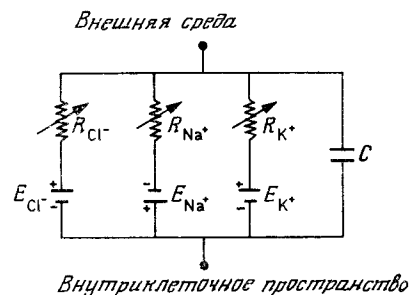


Рис. 5.4. Эквивалентный контур — электрическая модель мембраны нерва: параллельно соединенные батареи создают суммарный мембранный потенциал E , ионная проводимость обозначена сопротивлениями R , а емкость мембраны — в виде конденсатора C .

го контура. При этом равновесный потенциал представляет собой своеобразную электробатарею, а ионная проницаемость — омическое сопротивление, к тому же следует учесть электрическую емкость C , соответствующую двойному слою липидов (бислойная мембрана) с полярными головками, действующими как конденсатор.

Суммарный ток покоя должен уравнивать концентрации внутри и снаружи клетки. Когда мембрана возбуждена, скорость ионных потоков увеличивается. Для того чтобы эти потоки ингибировать, т. е. сохранить длительный постоянный потенциал покоя, пассивная диффузия катионов должна быть уравновешена активным транспортом (ионным насосом). К этому вопросу мы еще вернемся в гл. 6.

Возбуждение нейрона: локальный потенциал и потенциал действия

Выяснив электрические свойства клетки в состоянии покоя, рассмотрим процессы, связанные с возбуждением мембраны. Состояние возбуждения можно определить как временное отклонение мембранного потенциала от потенциала покоя, вызванное внешним стимулом. Этот электрический или химический стимул возбуждает мембрану, изменяя ее ионную проводимость, т. е. сопротивление в контуре снижается (рис. 5.4). Возбуждение распространяется от стимулированного участка к близлежащим областям мембраны, в которых наблюдается изменение проводимости, а следовательно, и потенциала. Такое распространение (генерация) возбуждения называется *импульсом*. Различаются два типа импульсов: *потенциал действия*, когда сигнал распространяется неизменным от участка возбуждения к нервному окончанию, и *локальный потенциал*, быстро уменьшающийся по мере удаления от участка возбуждения. Локальные потенциалы обнаружены в синапсах (*возбуждающие постсинаптические потенциалы* (е. р. с. р.) и *ингибиторные постсинаптические потенциалы* (и. р. с. р.)) и в сенсорных нервных окончаниях (*рецепторные* или *генераторные потенциалы*). Локальные потенциалы могут суммироваться, т. е. они могут увеличиваться при последующих возбуждениях, тогда как потенциалы действия не обладают такой способностью и возникают по принципу «все или ничего».

Можно создать нужное значение локального (или *электротонического*) потенциала, например если ввести в аксон гигантского кальмара положительные заряды, то они вызовут снижение отрицательного заряда или деполяризацию. От участка введения это немедленно распространится на значительное расстояние в зависимости от внутреннего сопротивления аксона. Сопротивление проводника обратно пропорционально его диаметру; таким образом, очень тонкие аксоны хуже проводят локальный потенциал, чем те, у которых диаметр больше; передача локального потенциала зависит не только от проводимости аксоплазмы и внеклеточной среды, но и от сопротивления мембраны аксона. Поскольку мембрана не очень хороший изолятор, часть введенных положительных зарядов (например, ионов калия) вытекает наружу, препятствуя деполяризации мембраны. С увеличением расстояния от места введения импульс ослабевает. В этом отношении аксон напоминает электрический кабель.

Используя приемы электротехники, представим мембрану разделенной на многие отдельные эквивалентные контуры, каждый из которых состоит из батареи, сопротивления и кон-

денсатора (рис. 5.5). Если ток проходит через один из контуров (или мембранный сегмент) с внешней стороны на внутреннюю, он соответственно входит в соседний контур (в соприкасающийся мембранный сегмент). Сила тока, конечно же, уменьшается, что обусловлено сопротивлением аксоплазмы и частично зарядкой конденсатора (загрузка мембраны ионами). При прохождении через последующие контуры сила тока уменьшается и быстро достигает нуля.

Продолжим сравнение аксона с электрическим кабелем: специфическое сопротивление аксоплазмы гигантского аксона кальмара R_{in} равно 30 Ом, а сопротивление внеклеточного пространства R_{out} равно 20 Ом. Медный провод такой же толщины проводит ток в $\sim 10^6$ раз лучше. Изоляция сокращает потери (сопротивление мембраны $R_m = 1000$ Ом, а при толщине мембраны 5 нм $R_m = 10^9$ Ом/см). Качество кабеля определяется

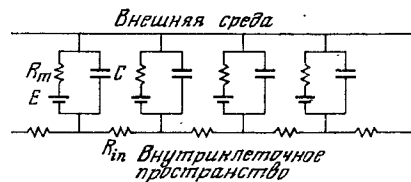


Рис. 5.5. Представление мембраны нерва в виде ряда параллельно соединенных контуров. R_m — сопротивление мембраны, R_{in} — внутреннее сопротивление.

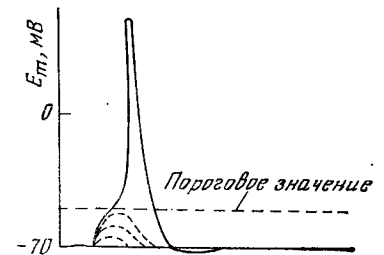
изменением потенциала вдоль проводника, что подчиняется экспоненциальному закону:

$$V = V_0 e^{-x/l}$$

где l , так называемая константа длины, — функция внутреннего сопротивления (сопротивления мембраны) и диаметра. Это означает, что при начальном потенциале V_0 на расстоянии x потенциал V уменьшается в e раз; для гигантского аксона кальмара x составляет всего несколько миллиметров. Таким образом, проведение сигналов в виде электротонических потенциалов было бы не очень эффективно. Основное различие между электрическим кабелем и аксоном заключается в способности аксона генерировать потенциалы действия.

Каким образом реализуется потенциал действия? Возвращаясь к гигантскому аксону кальмара с потенциалом покоя -70 мВ, введем некоторые понятия. Смещение этого потенциала в менее отрицательную область называется *деполяризацией*, а увеличение отрицательного значения — *гиперполяризацией*. Оба состояния можно достигнуть, подавая соответствующим образом направленный ток через электрод, введенный в аксон.

Если мембрана кратковременно и незначительно деполяризована (например, на 10 мВ), наблюдается слабый эффект, и после выключения деполяризующего тока мембранный потенциал быстро возвращается к исходному состоянию покоя. Этот процесс протекает во времени, поскольку мембрана является своеобразным конденсатором: сначала заряжается, а затем разряжается. Если вызвать более интенсивную деполяризацию, например, снизив потенциал до -40 мВ, то достигается необратимый эффект (порог), после которого мембранный потенциал уже не возвращается к потенциалу покоя, вместо этого деполяризация спонтанно усиливается (рис. 5.6), и, наконец, знак мембранного потенциала меняется на противоположный, т. е. теперь он положительный внутри. Когда достигается значение около $+40$ мВ, процесс вновь спонтанно устремляется к исходному состоянию — происходит реполяризация. При этом мембранный потенциал «проскакивает» значение потенциала покоя, а затем медленно возвращается к нему.



Пока представление о потенциале действия носило феноменологический характер, в дальнейшем необходимо рассмотреть лежащие в его основе молекулярные процессы. В гл. 6 эти вопросы обсуждаются подробно, здесь же рассмотрим лишь некоторые из них. В начале 50-х гг. английские физиологи Ходжкин и Хаксли исследовали потенциал действия и заложили основы современного понимания данного явления. Они показали, что первоначально падение потенциала (деполяризация) обусловлено «утечкой» ионов натрия (рис. 5.7). По достижении порогового значения ионные каналы в мембране открываются и пропускают ионы натрия. Последующая реполяризация происходит благодаря открытию специальных калиевых каналов и потока ионов калия в обратном направлении, т. е. изнутри наружу, одновременно закрываются натриевые каналы (инактивация). Из рис. 5.7 следует, что первоначально реполяризация превышает значение потенциала покоя, так как при равновесном потенциале для K^+ мембрана характеризуется более высоким отрицательным зарядом, чем при потенциале покоя. Это наблюдаемое различие медленно исчезает в результате закрывания калиевого канала и восстановления натриевого потенциала покоя. Инактивация

Рис. 5.6. Потенциал действия, генерируемый в случае, если сумма локальных потенциалов приближается к пороговому значению (горизонтальная штриховая линия).

Na^+ -канала подразумевает, что следующий потенциал действия не может реализоваться немедленно. Период покоя между двумя потенциалами действия называется *рефрактерным периодом*.

Продолжительность и направление потока ионов через мембрану нейрона и его разделение на Na^+ - и K^+ -составляющие могут регистрироваться методом фиксации напряжения — основным приемом электрофизиологии (рис. 5.8). На мембране с помощью специального электронного устройства поддерживает-

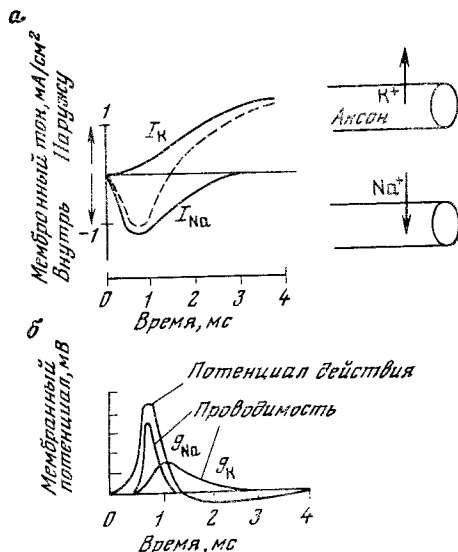


Рис. 5.7. Анализ потенциала действия. *a* — ионный ток, I_{Na} — направленный внутрь аксона, I_{K} — направленный наружу (с некоторым опозданием). Штриховая линия — сумма двух ионных токов; *б* — изменение мембранного потенциала в связи с временным возрастанием натриевой проводимости g_{Na} с последующим увеличением калиевой проводимости g_{K} .

ся заданное напряжение. В клетку вводят микроэлектрод, замыкают цепь и мембранный потенциал измеряют вольтметром. Любое изменение потенциала в цепи компенсируется соответствующим током, который отражает процессы, протекающие в мембране нейрона во время потенциала действия, и своевременно регистрируется осциллографом. Если необходимо получить только калиевую составляющую потенциала действия, натриевые каналы блокируются специфичными токсинами (гл. 6) — тетродотоксином (TTX) или сакситоксином (STX), а если необходима натриевая составляющая, калиевые

каналы блокируются тетраэтиламмонием или различными ампиридинами.

Каким образом потенциал действия, т. е. нервный импульс, распространяется от точки возникновения? Ответ на этот вопрос связан с потенциалзависимостью ионных каналов: при потенциале действия деполяризация вызывает открывание ионных каналов и, следовательно, вход Na^+ в соседние области мембраны (рис. 5.9). Все это приводит к дальнейшей деполяризации и открыванию ионных каналов в близлежащих мембранных зонах и т. д., пока процесс не достигает окончания аксона. Возникший сигнал распространяется в двух направлениях от точки возникновения: ортодромически от клетки и антедромически к ней.

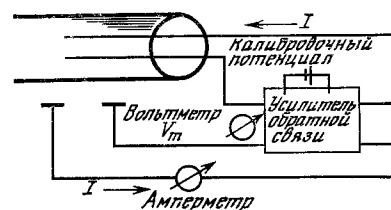


Рис. 5.8. Метод фиксации напряжения используется для регистрации ионных токов через мембрану клетки при постоянном мембранном потенциале: с помощью обратной связи компенсируются изменения потенциала вследствие утечки ионов.

Открывание ионного канала, по-видимому, сложный процесс; Ходжкин и Хаксли описали наблюдаемое увеличение ионной проводимости с помощью экспоненциальных уравнений (гл. 6). Несмотря на то что прошло уже более 25 лет, как они исследовали в деталях кинетику натриевого и калиевого потоков, практически ничего неизвестно о биохимии этих процессов. Недавно разработаны методы, с помощью которых можно охарактеризовать функционально важные молекулы мембраны нерва. Компоненты ионных каналов должны обладать весьма необычными свойствами, обуславливающими изменения потенциала, а также их координированные и кооперативные взаимодействия. Однако до сих пор по этому вопросу отсутствует строгая систематизация.

Передача синаптического сигнала

Нервные импульсы распространяются не только внутри клетки, но должны также передаваться соседним клеткам. Специализированная структура для межклеточной передачи называется *синапсом*. В гл. 8 и 9 рассматриваются биохимические аспекты

синаптической передачи, здесь же мы лишь вкратце остановимся на электрических процессах. В зависимости от природы передаваемых от клетки к клетке сигналов существуют электрические и химические синапсы. В *электрическом синапсе* потенциал действия распространяется непосредственно через место контакта между соседними мембранами. В *химическом синапсе* потенциал действия вызывает временную деполяризацию пресинаптической мембраны клетки с последующим высвобождением специфического вещества — медиатора, который диффундирует через *синаптическую щель* — межклеточное пространство в ~ 20 нм — к постсинаптической мембране; там и происходит их взаимодействие со специальными рецепторами. Затем с помощью молекулярных механизмов (гл. 9) генерируется постсинаптический ответ, который в зависимости от интенсивности может вызвать следующий потенциал действия. Химический синапс наиболее распространен и важен, поэтому мы остановимся на нем.

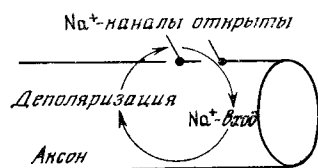


Рис. 5.9. Генерация потенциала действия. Ионы натрия, входящие в открытый натриевый канал, деполяризуют участок мембраны. Этот процесс способствует открыванию соседнего натриевого канала, что позволяет большему количеству ионов натрия свободно проходить через канал и т. д.

сердца, для которого Леви предложил название *Vagusstoff* (*блуждающей субстанции*); это вещество позднее было идентифицировано как ацетилхолин. Дейл в 1936 г. установил, что ацетилхолин выполняет роль медиатора в некоторой части периферической нервной системы и в нейромышечных узлах.

Ацетилхолин вызывает деполяризацию в постсинаптической мембране — *возбуждающий постсинаптический потенциал* (е. р. с. р.). В случаях некоторых нейромышечных синапсов данный потенциал называют *потенциалом концевой пластинки* (е. р. р.). Подобно локальному потенциалу, он быстро падает с увеличением расстояния от места возникновения и зависит от медиатора, т. е. если концентрация ацетилхолина увеличивается, деполяризация становится значительней. Если представить

Отто Леви в 1921 г. впервые в своем классическом эксперименте продемонстрировал химическую природу синаптической передачи. Он собрал перфузат из сердца лягушки до и во время стимуляции блуждающего нерва, ввел его во второе сердце и обнаружил ингибирование скорости сокращения сердца при использовании перфузата, собранного *в процессе стимуляции*. Перфузат, взятый *до стимуляции*, был неэффективен. Было предположено, что стимуляция блуждающего нерва вызывает секрецию вещества, ингибирующего работу

деполяризацию как функцию концентрации медиатора, результирующая кривая будет иметь S-образную форму. Как и в случае графического анализа зависимости ферментативной активности от концентрации субстрата, S-образная кривая указывает на кооперативное взаимодействие. По достижении заданной величины деполяризации реализуется потенциал действия. Деполяризация, вызываемая ацетилхолином, означает открытие ионных каналов. Очень важно отметить, что эти каналы открываются под влиянием молекулы медиатора и что они принципиально отличаются от электровозбудимых каналов, обуславливающих потенциал действия. Как сможем убедиться позже, два типа каналов имеют фармакологические отличия, т. е. они специфично взаимодействуют с определенными нейротоксинами или препаратами. И наконец, эти каналы отличаются по своей ионной специфичности. Так, потенциал действия генерируется двумя различными потенциалзависимыми ионными каналами: отдельно натриевыми и калиевыми каналами. В то же время ацетилхолин-активируемый канал практически одинаково проницаем для ионов натрия и калия. По-видимому, его размер достаточно большой, поскольку через него способны проникать ионы органических соединений, подобные метиламмию и даже гуанидину, вместе с тем он непроницаем для анионов (в частности, для Cl^-). В гл. 9 мы рассмотрим взаимоотношение постсинаптического рецептора (в данном случае — ацетилхолинового рецептора) и ионных каналов.

Уже упоминался второй тип локального потенциала, *ингибиторный постсинаптический потенциал* (i. p. s. p.). В то время как при возбуждающем постсинаптическом потенциале происходит деполяризация постсинаптической мембраны, ингибиторный постсинаптический потенциал приводит к гиперполяризации, т. е. дрейфу мембранного потенциала в сторону более отрицательных значений. Это достигается двумя способами: либо закрыванием катионных каналов, либо открыванием анионных каналов. Такой процесс называется ингибиторным, так как он подавляет возбудимость мембраны и таким образом ингибирует или тормозит деполяризующий ответ Na^+ - и K^+ -каналов.

Наиболее хорошо изучен медиатор торможения γ -аминомасляная кислота (ГАБА), находящаяся в центральной нервной системе, а также в нейромышечных синапсах беспозвоночных, например ракообразных, где она активирует Cl^- -каналы. Иногда ацетилхолин тоже может быть медиатором торможения, поэтому возникает любопытная ситуация: в одном и том же организме один и тот же медиатор оказывает возбуждающее и тормозящее действие. Например, у морского моллюска *Aplysia* (иногда называемого морской улиткой, хотя правильное морское слизень, или морской заяц) обнаружено три варианта эф-

фектов, вызываемых ацетилхолином: возбуждающее (возбуждающий постсинаптический потенциал), быстрое или более медленное тормозящее действие. В данном случае ацетилхолиновые рецепторы регулируют не только обычный Na^+ , K^+ -канал, но также хлорный или специфичный калиевый каналы.

Постсинаптическое ингибирование (ингибиторный постсинаптический потенциал), которое здесь уже рассматривалось, не следует путать с *пресинаптическим ингибированием*, которое связано с торможением секреции нейромедиатора при гиперполяризации нервного окончания. Гиперполяризация передается по аксону, в этом случае образуемому синапс с нервным окончанием возбуждающего волокна. Гиперполяризирующим нейромедиатором торможения пресинаптического синапса может быть GABA; эту же роль может выполнять энкефалин, который как возможный «эндогенный опиат» пресинаптически ингибирует в спинном мозге боль. С этим явлением встретимся вновь в гл. 9.

Фетт и Кац [3] в 1950 г. наблюдали необычный постсинаптический процесс: без пресинаптического возбуждения происходили небольшие, с амплитудой ~ 1 мВ сдвиги потенциала постсинаптической мембраны в сторону деполяризации. Авторы назвали их *миниатюрными потенциалами концевой пластинки* (т.е.р.р.) (рис. 5.10).

Наиболее вероятное объяснение существования подобных потенциалов сводится к тому, что они возникают в ответ на спонтанное высвобождение молекул нейромедиатора. Поскольку возникающие потенциалы всегда имеют одну и ту же величину (или кратные этой величины), то, вероятно, это просто ответ на действие вполне определенного количества медиатора. Медиатор, очевидно, не произвольно диффундирует из пресинаптической мембраны, а высвобождается порциями, называемыми *квантами*.

Согласно предложенной теории, потенциалы концевой пластинки складываются из нескольких сотен отдельных миниатюрных потенциалов. В одном кванте нейро-

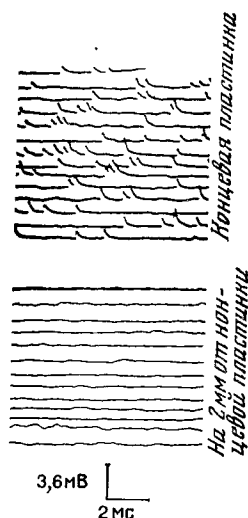


Рис. 5.10. Миниатюрные потенциалы концевых пластинок (т. е. р. р.). В области концевых пластинок они выглядят как большие случайные флуктуации напряжения, причина которых — спонтанное высвобождение нейромедиатора [3]. Подобные потенциалы невозможно зарегистрировать в нескольких миллиметрах от концевой пластинки, а также при блокаде пресинапса специфическими токсинами (ботулинический токсин).

медиатора содержится $\sim 10\,000$ молекул. Таким образом, предполагается, что единичным событием синаптической передачи (т.е.р.р.) является высвобождение кванта медиатора.

В пресинаптическом нервном окончании были обнаружены маленькие пузырьки, названные *синаптическими везикулами*. Сейчас известно, что в них содержится медиатор, в связи с этим высказано предположение, что квант медиатора высвобождается из одной везикулы путем экзоцитоза. В гл. 9 обсуждаются механизм и различные альтернативные гипотезы, касающиеся данного процесса.

Одиночные каналы и метод шумового анализа: электрофизиология на молекулярном уровне

Долгое время электрофизиологические методы использовались для исследования наиболее значительных процессов возбуждения: деполяризации и реполяризации всей мембраны, которые возникают как сумма большого числа единичных процессов — движения многочисленных ионов через множество каналов. Два современных экспериментальных подхода позволяют подробно исследовать одиночный ионный канал. При усовершенствовании электрофизиологических методов стало возможным провести измерение одиночных каналов в легко возбудимой мембране (рис. 5.11) [4]. Например, с помощью микроэлектрода (тоньше волоса) можно изучать функционирование ацетилхолинрегулируемого Na^+ , K^+ -канала нейромышечной концевой пластинки (гл. 9); регистрировать его открытия и закрытия, максимальную проводимость, определять чувствительность к фармакологическим агентам и измерять мембранные потенциалы. Описательная физиология, биофизический и биохимический подходы на молекулярном уровне стали, таким образом, тесно взаимосвязаны.

Значительным событием в электрофизиологии явилась разработка Нейером и Сакманом метода *петч-клампа* (метод локальной фиксации) [4]. Микроэлектрод помещается на анализируемую возбудимую мембрану так, чтобы был непосредственный контакт между концом электрода и мембраной. Такой подход предотвращает утечку тока из эктоплазмы по электроду и, следовательно, устраняет препятствие для измерения токов через мембрану. В месте контакта сопротивление составляет $\sim 10^{12}$ Ом. Такое качество контакта достигается путем специальной полировки и обработки кончика электрода и мембранной поверхности. Таким образом, предложенный метод сводится к измерению тока, проходящего через небольшую площадку поверхности мембраны ($5\text{--}10\text{ мкм}^2$), в которой все еще располагается много отдельных каналов. Подобрать подходящие экс-

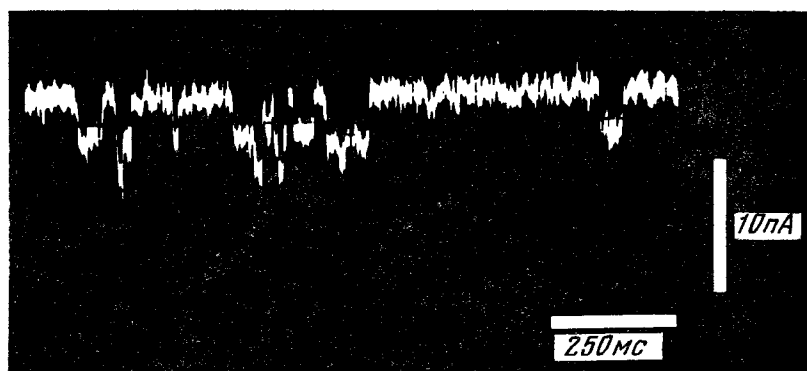
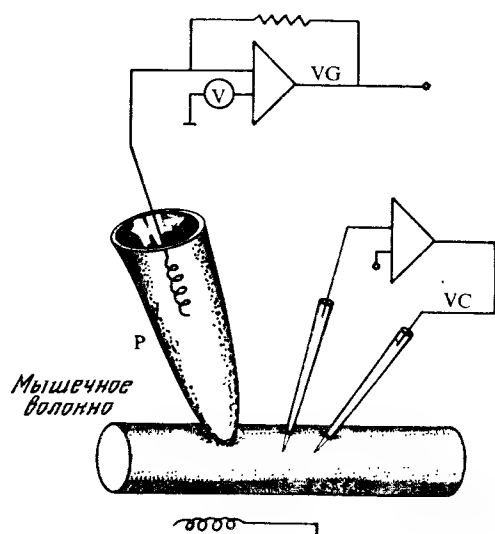


Рис. 5.11а. Регистрация одиночных каналов в нейромышечной концевой пластинке (метод петч-клампа). Вверху: VC — фиксация напряжения, P — пипетка (диаметр 3,5 мкм), содержащая раствор Рингера, VG — virtual grand, т. е. электрическая цепь, которая измеряет ток, проходящий через участок мембраны под кончиком пипетки. Внизу — осциллограмма регистрации тока через мембрану мышечного волокна; отдельные флуктуации тока интерпретируются как открытие и закрытие одиночных каналов. (Воспроизводится с разрешения.) [4].

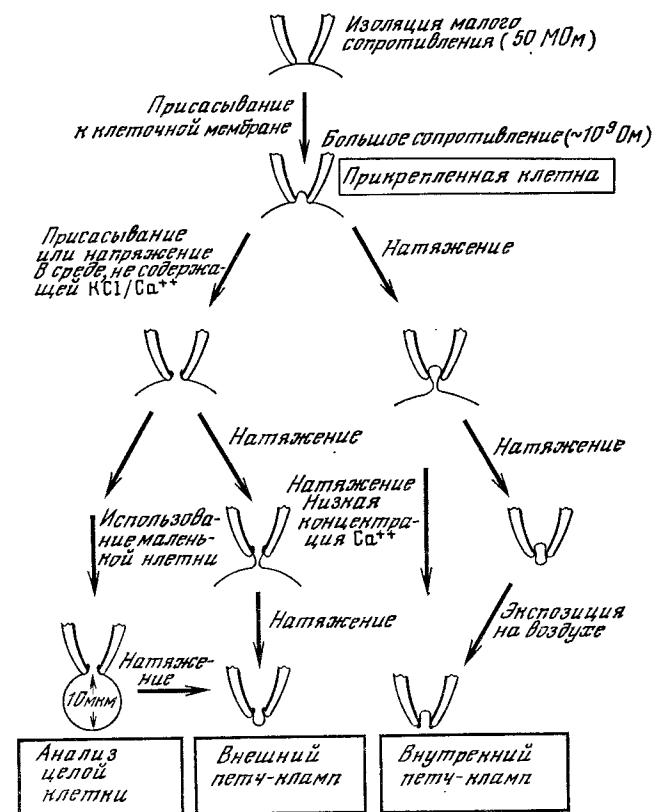


Рис. 5.11б. Большое сопротивление ($\sim 10^9$ Ом) при контакте микроэлектрода с поверхностью мембраны достигается путем подведения полированного кончика электрода к поверхности клетки и всасывания мембраны в электрод. Получение внутренних и внешних участков мембраны для исследования их методом петч-клампа зависит от дальнейшей обработки. (Предоставлено В. Sakmann, Göttingen.)

периментальные условия (концентрация медиатора, напряжение и т. д.), можно регистрировать одиночные каналы, измеряя проходящие через них малые токи (порядка пикоампер) [5].

Кроме того, метод анализа так называемого «шума» возбудимой мембраны (рис. 5.12) позволил расширить количество применяемых методов изучения ионных каналов [6—8]. Рассмотрим кратко этот подход без вывода математических формул. Нервный импульс состоит из потоков ионов, проходящих через мембрану. Они проходят через каналы, регулирующие проницаемость мембраны, например, для Na^+ или K^+ . Как показано в гл. 6, в состав этих каналов входят два функциональ-

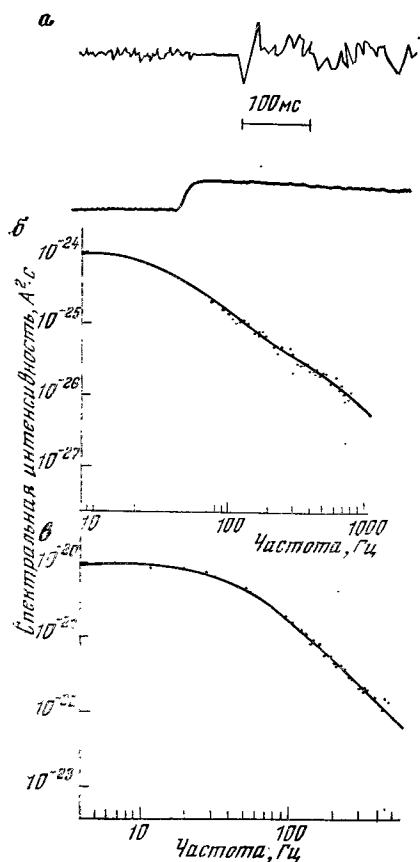


Рис. 5.12. Шумовой анализ аксональной (а и б) и постсинаптической (в) мембран. а — флуктуации тока в мембране перехвата (при постоянном напряжении); б и в — частотный спектр шума в ацетилхолин-активированных каналах нейромuscularной концевой пластинки. (Воспроизведено с разрешения.) [6].

мембрану, определяется вклад различных частот в суммарный процесс, затем полученные данные обычно представляют в виде зависимости спектральной плотности от частоты. Вторым этапом является сравнение экспериментальных и теоретически рассчитанных данных, что позволяет выявить специфические свойства воротного механизма. Если данные согласуются, то это доказывает правильность сформулированной гипотезы.

ных компонента: селективный фильтр, определяющий вид диффундирующих через мембрану ионов, и воротный механизм, который в ответ на внешний сигнал регулирует время, скорость и продолжительность открытия канала. Открытие канала — статистический процесс, т. е. сигнал (деполяризация аксона, связывание медиатора с постсинаптическим каналом; см. гл. 6) увеличивает вероятность того, что канал откроется. Это является отправной точкой метода шумового анализа: число открытых каналов варьирует вблизи некоторой вероятной величины. Например, если вероятность равна 0,5, тогда в среднем открыто 50 каналов на сотню, но фактически в одной точке их может быть 48, а чуть позже уже 52. Такие флуктуации называются шумом, анализ которого дает возможность понять кинетику и принцип действия воротного механизма, так как частота — скорость флуктуаций вблизи среднего значения — зависит от кинетики единичного события.

Шумовой анализ начинается с записи спектра частот. Далее математическим анализом (анализ Фурье) «шума», например потенциала через

Рассмотрим конкретный пример, где использовался шумовой анализ. Работу ионного канала могут регулировать различные параметры: его проводимость ограничивается либо скоростью, с которой молекула медиатора (в случае постсинаптического канала) диффундирует от рецептора или деградирует, либо реакцией канала на сигнал. В настоящее время принято считать, что конформационные изменения мембранных белков обуславливают изменение проницаемости в мембране нерва. С помощью шумового анализа было показано, что в случае постсинаптического ацетилхолинового рецептора закрытие канала в большей степени, чем удаление и гидролиз ацетилхолина, определяет продолжительность тока через концевую пластинку.

В этой главе мы не вдаемся в подробности теории и практики метода шумового анализа, более важно иметь детальное представление, какие же свойства (параметры) ионных каналов можно определить с помощью данного метода. Вот что можно найти:

- 1) проводимость одиночного канала;
- 2) среднее время открытия канала или скорость его закрытия;
- 3) число состояний канала, т. е. принцип работы канала («все или ничего» — когда канал находится только в открытом или закрытом состоянии, имеются еще какие-либо другие состояния для различных типов проводимостей);
- 4) число каналов на единицу площади мембраны.

Ценность метода шумового анализа заключается еще и в том, что таким образом можно изучить влияние различных параметров (рН, мембранного потенциала, температуры, природы нейромедиатора) на функционирование ионных каналов.

Выводы

Здесь вполне уместно привести определения наиболее важных терминов электрофизиологии.

Мембранный потенциал — разность потенциалов между внутренней и наружной сторонами мембраны клетки, возникающая вследствие неравномерного распределения ионов.

Потенциал покоя — мембранный потенциал, существующий до (или значительно позже) стимуляции нервной клетки.

Потенциал действия — временное изменение мембранного потенциала в период стимуляции клетки, распространяется от точки возникновения в обоих направлениях. Возникает по принципу «все или ничего». Синонимы: нервный импульс, импульс, пик (spike).

Рефракторный период — временной промежуток, следующий за потенциалом действия, в течение которого мембрана невозбудима.

Локальный (местный) потенциал — потенциал при деполяризации мембраны, который быстро уменьшается по мере удаления от точки возникновения, но не доходит до конца клетки подобно потенциалу действия. Данные потенциалы могут суммироваться.

Пороговая деполяризация — предельный мембранный потенциал, возникающий при деполяризации, когда мембрана не возвращается к потенциалу покоя, а генерирует в потенциал действия.

Деполяризация — уменьшение ионного дисбаланса по обе стороны мембраны.

Гиперполяризация — увеличение ионного дисбаланса по обе стороны мембраны, сдвиг мембранного потенциала к более отрицательным значениям.

Эквивалентный контур — моделирование электрических свойств мембраны клетки с помощью электротехнической терминологии: сопротивление, конденсатор, батарея.

Возбудимый постсинаптический потенциал (е. р. с. р.; в. п. с. п.) — потенциал, возникающий при деполяризации постсинаптической мембраны, суммарный локальный потенциал при достижении пороговой деполяризации, генерирующей потенциал действия.

Потенциал концевой пластинки (е. р. р.; к. п. п.) — возбуждающий постсинаптический потенциал нейромышечного синапса или концевой пластинки.

Миниатюрный потенциал концевой пластинки (м. е. р. р.; м. к. п. п.) — небольшие спонтанно возникающие флуктуации мембранного потенциала постсинаптической мембраны, продуцируемые одновременным (т. е. без стимуляции) высвобождением пресинаптических молекул медиатора.

Ингибиторный постсинаптический потенциал (и. р. с. р.; и. п. с. п.) — потенциал, возникающий при гиперполяризации постсинаптической мембраны путем изменения проводимости Cl^- или K^+ . Ингибиторный потенциал поднимает порог, необходимый для генерирования потенциала действия.

Шум — статистические небольшие изменения (флуктуации) мембранного потенциала, обусловленные спонтанными изменениями проводимости ионов в мембране. Проявляются в виде открывания и закрывания ионных каналов.

Ионный канал — молекулярная структура в мембране клетки, селективно проницаемая для отдельных ионов. Существует в двух состояниях: открытом и закрытом.

Медиатор — вещество, передаваемое в синапсе от одной клетки к другой во время прохождения нервного импульса.

Рецептор — связывающий центр для молекул медиатора,

распознающий биологические сигналы в постсинаптической мембране.

Квант — порция высвобожденных из пресинапса молекул медиатора, вызывающая появление миниатюрного потенциала концевой пластинки; вероятно, содержится в одной синаптической везикуле.

Инактивация — по-видимому, спонтанное закрывание ионных каналов, например потенциалзависимого натриевого канала мембраны клетки.

Активация — открывание ионных каналов, например при деполяризации или при взаимодействии с нейромедиатором.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Katz B., Nerve, Muscle, and Synapse, McGraw-Hill, New York, 1966.
2. Aidley D. J., The Physiology of Excitable Cells, Cambridge University Press, Cambridge, 1978.
3. Fatt P., Katz B., Spontaneous subthreshold activity at motor nerve endings, J. Physiol., **117**, 109—128 (1952).
4. Neher E., Sakmann B., Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres, Nature, **260**, 799—802 (1976).
5. Sakmann B., Bormann J., Hamill O. P., Ion transport by single receptor channels, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **48**, 247—257 (1983).
6. Stevens C. F., Study of membrane permeability changes by fluctuation analysis, Nature, **270**, 391—396 (1977).
7. McBurney R. N., New approaches to the study of rapid events underlying neurotransmitter action, TINS, **6**, 297—302 (1983).
8. Neher E., Stevens C. F., Conductance fluctuation and ionic pores in membranes, Ann. Rev. Biophys. Bioeng., **6**, 345—381 (1977).

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА

- Chang D. C., Tasaki I., Adelman W. J., Leuchtag H. R. (eds.), Structure and Function in Excitable Cells, Plenum Press, New York and London, 1983.
- Kandel E. R., Schwartz J. H. (eds.), Principles of Neural Science, Arnold, London, 1981.
- Sakmann B., Neher E. (eds.), Single Channel Recording. Plenum press, New York, 1983.

ИОННЫЕ КАНАЛЫ

Нервные клетки способны проводить электрические сигналы; ионные токи через клеточную мембрану периодически генерируют разность потенциалов между внутренней и наружной сторонами мембраны (гл. 5).

Активный и пассивный ионный транспорт независимы

В этой главе рассматриваются компоненты мембран клетки, регулирующие и обеспечивающие транспорт ионов, особенно Na^+ и K^+ (рис. 6.1). Подобные мембранные системы, расходуя метаболическую энергию клетки, могут перекачивать ионы из менее концентрированного в более концентрированный раствор (активный транспорт, ионный насос). В результате теплового движения и под действием электрохимического потенциала ионные токи могут менять направление без потребления метаболической энергии (пассивный транспорт). Для проведения нервного импульса энергетически необходимы оба процесса — активный транспорт ионов против градиента концентрации (как бы в гору) и пассивная диффузия по градиенту (как бы с горы). Таким образом, чтобы поддерживать ионный баланс, пассивные ионные токи должны компенсироваться активным транспортом. Здесь рассматривается только пассивный ионный транспорт; активный транспорт и его Na^+ , K^+ -насос, движущей силой которого является энергия, высвобождаемая в результате гидролиза АТФ (Na , K -зависимая АТРаза, или Na^+ , K^+ -насос), обсуждаются в гл. 7. Такое подразделение уже указывает на то, что в процессе принимают участие биохимически различные структуры. Существует несколько доказательств в пользу этого.

1. Далее более подробно изложены фармакологические различия между активным и пассивным транспортом. Специфические ингибиторы активного ионного транспорта, например убаин (строфантин), не влияют на пассивные ионные токи, а селективные блокаторы пассивного потока Na^+ тетродотоксин (ТТХ) и сакситоксин (СТХ) не действуют на насос.

2. Na^+ , K^+ -насос работает независимо от мембранного потенциала; однако пассивные токи возникают при деполяризации и являются потенциалзависимыми.

3. Ингибиторы метаболической энергии блокируют ионный насос, но не оказывают влияния на пассивный ионный транспорт, который не изменяется, даже если цитоплазма удаляет-

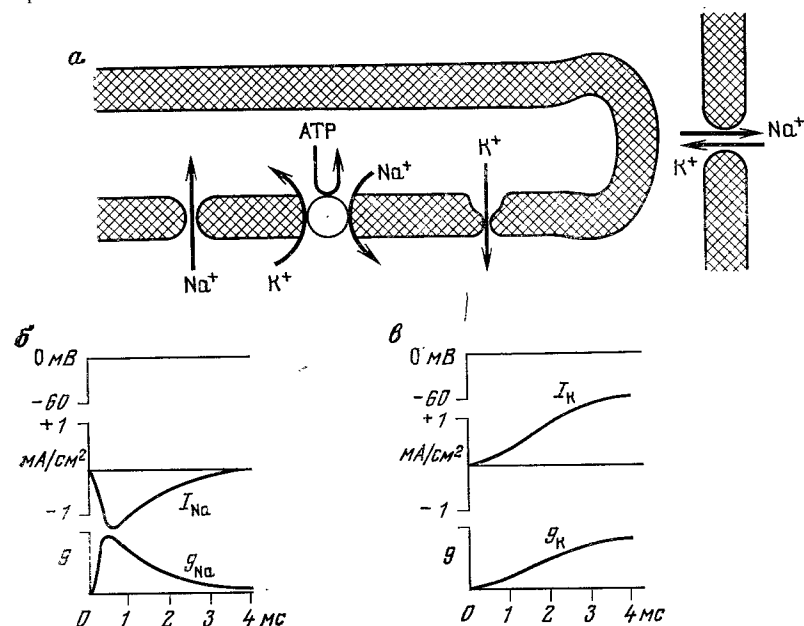


Рис. 6.1. а — схема нервного волокна с синапсом. Показаны системы транспорта (АТРаза) и три различные системы пассивного транспорта. Справа — хемовозбудимая транспортная система, регулируемая молекулой нейромедиатора, например канал в постсинаптической мембране мышечной концевой пластинки, пропускающий ионы калия и натрия; слева — отдельно Na^+ - и K^+ -каналы в мембране аксона, управляемые электрическим полем и открываемые при деполяризации; б и в — проводимость натрия g_{Na} (б) и калия g_{K} (в), а также входящий натриевый I_{Na} и выходящий калиевый I_{K} токи после деполяризации (60 мВ). Четко дифференцированная кинетика двух процессов g_{Na} и g_{K} подразумевает существование индивидуальных молекулярных структур для пассивного натриевого и калиевого транспорта.

ся полностью и, следовательно, прекращается метаболизм. Это было показано на гигантских аксонах кальмара, где наблюдается нормальный потенциал действия даже после полного вытеснения аксоплазмы и перфузии волокна солевым раствором.

4. Процессы активного и пассивного транспорта имеют различную температурную зависимость. Подобно химической реакции, активный транспорт ускоряется с повышением темпера-

туры, в то время как максимальная проводимость ионов натрия при пассивном транспорте характеризуется низким температурным коэффициентом, причем изменение температуры влияет только на открывание натриевых каналов, а максимальная проводимость открытых каналов не зависит от температуры.

5. Прочие различия в системах ионного транспорта становятся очевидными при рассмотрении их ионной селективности, максимальной емкости и числа каналов на единицу поверхности мембраны (табл. 7.1).

Химическая и электрическая регуляция пассивных ионных токов

Системы пассивного транспорта, называемые далее *каналами*, не являются единой группой функциональных элементов в мембране. В состоянии покоя каналы закрыты и переходят в проводящее состояние только после их открытия. Открывание, или воротный механизм, запускается электрическим путем, т. е. при изменении мембранного потенциала, или химическим путем — при взаимодействии со специфической молекулой. Химическая природа воротного механизма в тесной связи с биохимией синапса рассмотрена в гл. 8 и 9. Хотелось бы лишь отметить, что воротный механизм также отличается от других транспортных систем по своей фармакологии, ионной селективности и кинетике.

Пассивный транспорт ионов Na^+ не зависит от транспорта ионов K^+

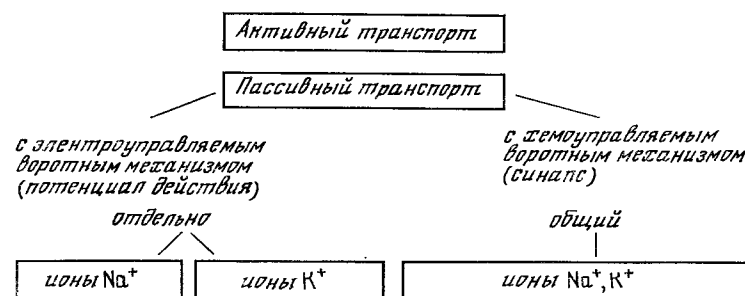
Вновь обсудим электровозбудимые каналы, которые обеспечивают пассивный транспорт ионов Na^+ и K^+ . Тщательный анализ возникновения потенциала действия гигантского аксона кальмара, проведенный Ходжкин и Хаксли [1—3], показал, что существуют по крайней мере два различных (отдельных) канала: после деполяризации мембраны открывается натриевый канал, обуславливающий входящий поток ионов Na^+ ; через некоторое время открывается калиевый канал и поток ионов K^+ устремляется в противоположном направлении (рис. 6.1). Известно, что проницаемость мембраны для ионов Na^+ и K^+ не увеличивается одновременно. Кроме того, имеются еще два факта, которые доказывают существование двух отдельных каналов.

1. Если искусственным образом продлить деполяризацию аксональной мембраны, то натриевые каналы при этом закрываются (что в электрофизиологии рассматривается как инак-

вация), однако калиевые каналы остаются открытыми в течение всего периода деполяризации.

2. Как известно, существуют селективные ингибиторы для различных ионных токов. Тетродотоксин и ряд других токсинов специфически блокируют натриевый канал, не оказывая влияния на калиевый. Напротив, ион тетраэтиламмония (ТЭА) ингибирует поток ионов калия, не влияя на транспорт ионов натрия.

Следовательно, можно заключить, что в мембране аксонов, и естественно не только в ней, существуют независимые системы ионного транспорта (схематически изображенные на рис. 6.1):



Интересно, различаются ли молекулярные структуры у этих систем. Одна из задач современной нейробиологии заключается в биохимической характеристике этих систем [4]. Далее рассмотрены подтвержденные экспериментально результаты, а также возможные модели, гипотезы, выдвинутые на основе этих результатов.

Воротный механизм и селективный фильтр — функциональные элементы ионных каналов

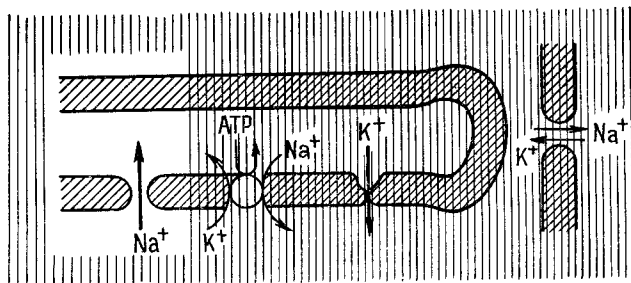
Задача нейробиологических исследований состоит в том, чтобы на основе биохимического анализа и электрофизиологических данных получить представление о структуре и функции ионного канала. Это представление должно включать следующие два понятия:

1. Воротный механизм, который регулирует перенос ионов.
2. Селективный фильтр, характеризующий специфичность для определенных ионов.

Электрофизиологические и биохимические эксперименты включали электронно-микроскопические исследования, а также измерение биофизических параметров мембраны аксона во время возбуждения. Полученные данные демонстрируют, насколько

ко неполно наше представление об ионных каналах и потенциале действия на молекулярном уровне.

Натриевый канал: воротный механизм



На рис. 6.1 приведено изменение во времени натриевого тока I_{Na} при фиксированном потенциале в ходе замедленной деполяризации: входящий ток увеличивается максимально (рис. 6.1, б) и спонтанно уменьшается пока вновь не восстановится потенциал покоя.

Проводимость мембраны для ионов натрия g_{Na} зависит от потенциала и времени. Ходжкин и Хаксли [3] вывели следующее уравнение в случае гигантского аксона кальмара:

$$g_{Na} = \bar{g}_{Na} m^3 h$$

где $\bar{g}_{Na}$ — максимальная проводимость на единицу площади поверхности мембраны, m и h — безразмерные величины, с помощью которых учитываются активация (m) и инактивация (h) каналов. Эти величины определяются дифференциальными уравнениями

$$\frac{dm}{dt} = \alpha_m (1 - m) - \beta_m m$$

$$\frac{dh}{dt} = \alpha_h (1 - h) - \beta_h h$$

где α и β — потенциалзависимые константы скорости прямой и обратной реакций.

Переменные m и h характеризуют кинетику активации и инактивации. Молекулярная основа уравнения неясна, хотя при активации реализуется явление, напоминающее кооперативность, хорошо известную для ферментов.

Однако основным предположением в уравнении Ходжкин — Хаксли является активация или воротный механизм. Ионный канал должен содержать компонент, который в зависимости от приложенного потенциала либо открывает канал для катионов

(что означает активацию в электрофизиологическом смысле), либо блокирует его (инактивация). Зависимость от потенциала указывает на то, что компонент несет электрический заряд (вероятно, это диполь) и может смещаться при изменении мембранного потенциала. Эти перемещения зарядов в мембране могут быть экспериментально зафиксированы, если измерения проводить через время менее чем через 1 мкс после деполяризации в виде очень небольших положительных токов (независимо для Na^+ - и K^+ -токов), направленных изнутри наружу мембраны и нечувствительных к действию обычных ингибиторов ионных токов [5—7]. Они называются воротными токами и обусловлены вращением молекулярных диполей или перераспределением зарядов при конформационных изменениях, например, мембранных блоков. На рис. 6.2 [8] изображены две обсуждаемые в настоящее время модели функционирования каналов. Активация натриевого канала заключается в удалении положительного заряда, который ингибирует проход положительно заряженных ионов Na^+ . Этот процесс происходит при вращении частицы m в модели Роджаса (рис. 6.2, а) или при частичном изменении конформации спиральной структуры (рис. 6.2, б). Состояние инактивации вызвано появлением положительного заряда на канале при замедленном вращении частицы h относительно частицы m (рис. 6.2, а) или дальнейшим медленным конформационным изменением (рис. 6.2, б). Для подтверждения существования постулированных частиц m и h необходимы биохимические эксперименты.

На порог возбуждения влияют ионы кальция, а не m^3

Увеличение концентрации ионов кальция в аксонах увеличивает порог возбуждения, т. е. для возникновения потенциала действия необходима большая степень деполяризации. В то же время кинетика активации натриевого тока существенно не меняется в отсутствие ионов кальция, которые поэтому прямо не связаны с воротным механизмом. Кальций скорее всего не оказывает непосредственного действия: катион влияет на свойства мембраны как противоион к заряду поверхности.

Натриевый канал: селективный фильтр

Наряду с воротным механизмом еще одним необходимым функциональным элементом ионного канала является селективный фильтр [9]. Проницаемость натриевого канала для Na^+ в 12 раз выше, чем для K^+ , и почти такая же, как для Li^+ (табл. 6.1). Прямая зависимость снижения проницаемости канала от увеличения радиуса проходящих ионов позволяет рас-

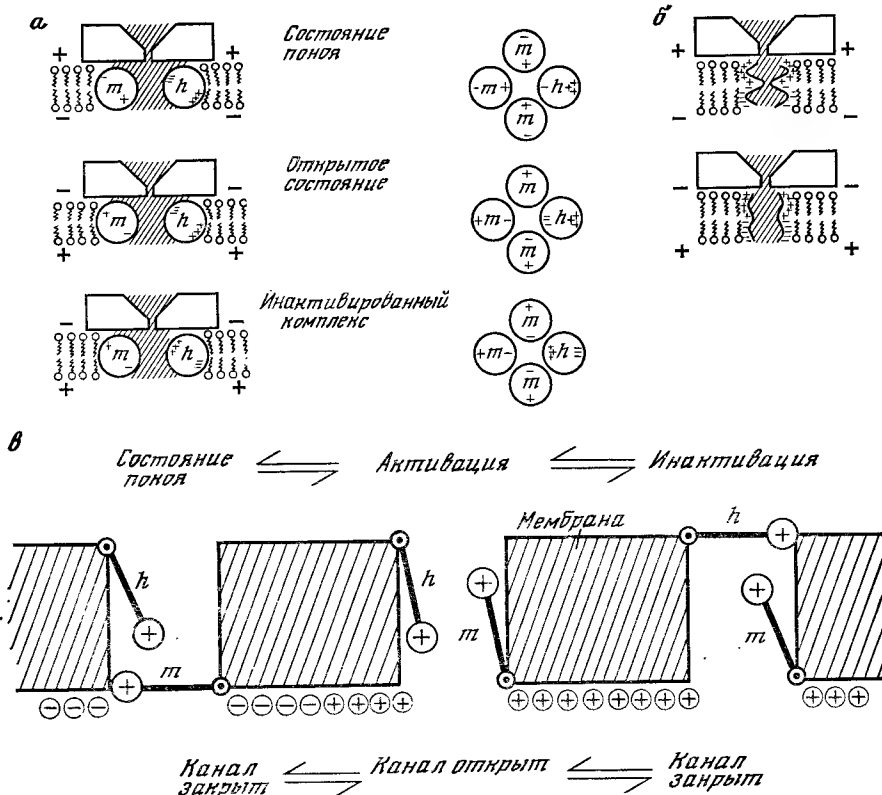


Рис. 6.2. Модели электроуправляемого воротного механизма. *а* — электрические диполи *т* при деполяризации переориентируются (т. е. положительный заряд появляется на внутренней стороне мембраны аксона) от положения в состоянии покоя (верхний рис.) к активному состоянию (средний рис.). Следовательно, проход положительно заряженных ионов натрия через канал не блокируется положительными зарядами. После короткой паузы диполь *h* меняет направление и инактивирует канал (нижний рис.); *б* — альтернативный механизм, при котором вращающиеся диполи соответствуют конформационным изменениям в спиральной части мембранных молекул. (Воспроизведено с разрешения Кеупес.) [8]; *в* — функциональная модель натриевого канала, воротные частицы *т* и *h* — независимые подвижные заряды.

Таблица 6.1. Ионная проницаемость натриевого канала

Ион	Относительная проницаемость P/P_{Na}
Li^+	1,1
Na^+	1,0
K^+	0,083
Rb^+	0,025
Cs^+	0,016

смагивать фильтр селективности как своего рода сито. Это справедливо по крайней мере лишь частично, так как калиевый канал практически непроницаем для более маленьких Li^+ и Na^+ . Даже если вместо негидратированного иона, чья энергия сольватации и гидратации увеличивается с уменьшением радиуса, во внимание принимается гидратированный ион, модель сита имеет свои определенные несоответствия; различия в радиусах гидратированных ионов объясняет меньшую проницаемость калиевого канала для Li^+ , но не проливает свет на более высокую проницаемость для Na^+ . Таким образом, концепция фильтра ничего не говорит нам о его структуре и механизме действия.

Хилле [10] провел серию элегантных экспериментов, позволяющих лучше понять механизм действия натриевого канала. Сравнивая проницаемость ионов щелочных металлов и органических катионов (табл. 6.2), он определил средний размер канала, составляющий 0,3–0,5 нм, и пришел к выводу, что канал окружен кольцом атомов кислорода, входящих в состав карбоксильных групп мембранного белка. Хилле считает, что селективность зависит не только от размеров проникающих ионов, но и от их способности образовывать водородные связи. Для подтверждения этой точки зрения ниже сравниваются три иона:

гидроксиламмоний	$H_3N^+—OH$
гидразиний	$H_3N^+—NH_2$
метиламмоний	$H_3N^+—CH_3$

Это практически изостерические ионы; радиусы Ван-дер-Ваальса гидроксильной, амино- и метильной групп составляют 0,37–0,38 нм, однако проницаемость иона гидроксиламмония в ~100 раз выше, чем для иона метиламмония. Такие различия объясняются тем, что метильные группы не образуют водородных связей. Длина связи между донором и акцептором водорода на 0,08 нм короче суммы радиусов Ван-дер-Ваальса; та-

Таблица 6.2. Проницаемость натриевого канала для однозарядных неорганических и азотсодержащих органических ионов

Ион	P/P_{Na}	Ион	P/P_{Na}
Натрий	1,0	Метиламмоний	0,007
Гидроксиламмоний	0,94	Ацетамидиний	0,008
Гидразин	0,59	Метилгуанидиний	0,010
Таллий	0,33	Диметиламмоний	0,007
Аммоний	0,16	Тетраметиламмоний	0,005
Формамидиний	0,14	Тетраэтиламмоний	0,008
Гуанидиний	0,13	Этаноламмоний	0,014
Гидроксигуанидиний	0,12	Холиний	0,007
Калий	0,083	Трис(гидроксиметил)- метиламмоний	0,007
Аминогуанидиний	0,06	Имидазолий	0,008
N-Метилгидроксиламмоний	0,056	Бигуанидиний	0,010
Метилгидразоний	0,025	Триаминогуанидиний	0,013

ким образом, открывание канала на 0,3 нм приводит к диффузии иона гидроксиламмония, а не иона метиламмония.

На основании этих и других данных Хилле заключил, что ионы натрия проникают в канал не путем простой диффузии, а в результате последовательных стадий дегидратации и связывания с компонентами канала [11]. Это означает преодоление энергетических барьеров, из которых наиболее существен фильтр селективности (рис. 6.3). Фильтр образован атомами кислорода, причем рН-зависимость натриевой проводимости показывает, что в его состав входят карбоксильные группы.

Канал или переносчик?

Многие предпочитают говорить не о натриевых каналах, или порках, а о системе переноса ионов натрия, поскольку они избегают обсуждения молекулярных структур и механизма ионного транспорта через мембрану. Действует ли данная система как канал или как переносчик [12]? Переносчик может обеспечить скорость потока ионов $\sim 10^4$ ионов/с, т. е. на три порядка меньше, чем через поры. Следовательно, натриевая транспортная система функционирует как порок. Далее при биофизическом подходе механизмы переноса различаются по зависимости скорости ионного транспорта от концентрации. При существовании переносчика насыщение достигается при высоких концентрациях, когда все молекулы переносчика несут ионы, в то время как диффузия ионов через канал определяется только броуновским движением ионов и электрохимическим градиентом, т. е. отдельные ионы проходят сквозь мембрану,

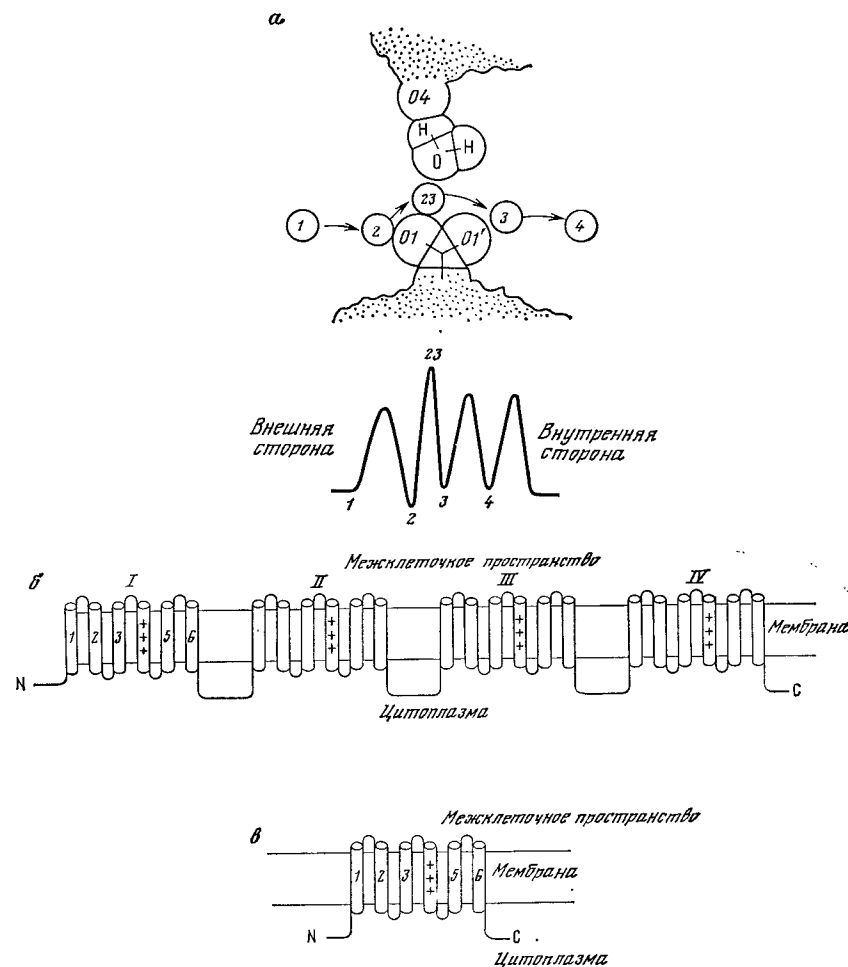


Рис. 6.3. а — модель Хилле ионного транспорта через натриевый канал. Свободный ион (1) связывается (2) и десольватируется (23); затем ион ресольватируется на внутренней стороне мембраны (3) и диссоциирует из открытого канала (4). Внизу — энергетическая диаграмма данного процесса: стадий, определяющей скорость, является преодоление энергетического барьера (23), представляющего собой селективный фильтр; б и в — возможная трансмембранная организация ионных каналов; б — аминокислотные последовательности натриевых и кальциевых каналов, установленные при анализе соответствующих кДНК, имеют четыре высокомолекулярных домена, причем каждый имеет шесть гидрофобных, возможно, трансмембранных спиральных участков (цилиндров). Четвертый домен имеет необычную последовательность Arg-X-X-Arg-X-X-Arg-X-X, которая может быть частью воротного механизма канала; в — исследованные до настоящего времени калиевые каналы имеют только один положительно заряженный участок.

не конкурируя с другими похожими или отличными от них ионами. Данный принцип независимости, сформулированный Ходжкин и Хаксли, выражен следующим уравнением:

$$\frac{I'_{\text{Na}}}{I_{\text{Na}}} = \frac{[\text{Na}_{\text{out}}]' - [\text{Na}_{\text{in}}] \exp(FE/RT)}{[\text{Na}_{\text{out}}] - [\text{Na}_{\text{in}}] \exp(FE/RT)}$$

I'_{Na} и I_{Na} — количество ионов натрия в потоке при двух различных концентрациях. Соответствующие индексы при концентрации обозначают внешнюю и внутреннюю стороны мембраны. E — разность потенциалов $E_{\text{in}} - E_{\text{out}}$, F — число Фарадея.

Хотя электрофизиологические измерения вроде бы подтверждают принцип независимости, тем не менее очевидны несоответствия для систем транспорта натрия и калия. То, что ионные каналы возбудимой мембраны надо рассматривать не как простые отверстия, может быть доказано тем, что насыщение при высокой концентрации ионов аналогично насыщению фермента субстратом, а также взаимной конкуренцией между ионами Na^+ и непроницающими ионами, которые блокируют канал. Модель Хилле свидетельствует о том же, демонстрируя возможность натриевого канала связывать одновременно только один ион Na^+ с константой диссоциации K_D 368 мМ. В классической модели лиганд соединяется с молекулой переносчика и переносится с внешней поверхности мембраны на внутреннюю, где ион высвобождается. В данном случае этот механизм не наблюдается. Следовательно, натриевая транспортная система должна рассматриваться как канал с катионсвязывающим центром (и воротной системой); в отличие от переносчика канал пронизывает мембрану и является неподвижным.

Некоторые физические свойства натриевого канала

Температурный коэффициент Q_{10} натриевой проводимости равен 1,3, что соответствует коэффициенту диффузии ионов натрия в воде. Данное значение характеризует энергетический барьер (~ 17 кДж/моль) и наряду с высокой константой диссоциации (K_D 368 мМ) объясняет ту легкость, с которой ион натрия проходит через мембрану. Скорость диффузии Na^+ составляет 10^8 ионов/с. Проводимость одиночного канала аксона кальмара, установленная методом шумового анализа, равна $4 \cdot 10^{-12}$ Ом $^{-1}$, что составляет $1/3$ проводимости калиевого канала.

Биохимическая характеристика натриевого канала

Для выделения и биохимической характеристики биомолекулы необходимо иметь хороший исходный материал и владеть соответствующим методом идентификации. Для контроля чистоты

Таблица 6.3. Натриевые каналы в возбудимых мембранах [13]

Ткань	Аксональная поверхность, см 2 /г	Концентрация, ммоль/г	Константа диссоциации K_D , ммоль/л	Плотность натриевых каналов, центры связывания/мкм 2
Нерв				
морской щуки	65 000	377	9,8	35
омара	7000	94	8,5	90
кролика	600	110	1,8	110
кальмара	80	—	—	550
кролика (перехват Ранвье)	8,2	17,1	3,4	12 000
Мышца				
лягушки	350—550	14—37	3—5	200—380
крысы (диафрагма)	700	24,5	3,8	206

ферментов используется определение их каталитической активности. При выделении компонентов ионного канала подобный контроль не подходит. В идеале активность канала можно анализировать следующим образом: выделенный мембранный материал (т. е. пору) реконструируют в искусственную липидную мембрану (гл. 3), в которой возможно измерение электрической проводимости. При этом следует учесть тот факт, что выделенный материал должен содержать все функционально важные компоненты канала. В связи с тем что эксперименты по реконструкции компонентов нервных мембран оказались не достаточно перспективными, а также весьма сложными, возникла необходимость разработки новых методов. Тестирование активности (т. е. ионный транспорт) заменили анализом связывания с радиоактивно меченными лигандами, например с нейротоксинами. Предварительно электрофизиологическими методами было показано их селективное взаимодействие с определенным каналом. В случае натриевого канала использовались меченные тритием тетродотоксин [^3H]TTX или сакситоксин [^3H]STX [13], так как их константы диссоциации (10^{-9} М) позволяют проводить радиолигандный анализ.

Исходный материал для выделения должен быть доступным в достаточном количестве, кроме того, каналы в нем должны присутствовать в возможно высокой концентрации. Из табл. 6.3 следует, что плотность натриевых каналов на единицу площади поверхности мембраны весьма незначительна, причем их число непостоянно [13]. При средней плотности 50 каналов/мкм 2 каждый канал окружен $3 \cdot 10^6$ молекулами липидов. Каналы находятся в липидной среде на расстоянии ~ 140 нм друг от друга.

В электрическом органе электрического угря *Electrophorus electricus* (модель для многочисленных нейробиохимических исследований; см. гл. 12) функциональный потенциалзависимый натриевый канал построен из одной гигантской полипептидной цепи (см. далее). Этот белок (M 260 000), связывающий ТТХ, может быть реконструирован в искусственные липидные везикулы. В этих реконструированных системах методом петч-кламп обнаружены все ожидаемые функциональные свойства канала: потенциалзависимость проводимости, селективность для Na^+ , инактивация, чувствительность к ТТХ и батрахотоксину.

Еще одна трудность выделения натриевых каналов связана с их сравнительной нестабильностью вне мембраны. Пока известны лишь следующие биохимические характеристики канала: ТТХ-связывающий компонент мембраны аксона с M 230 000 (по данным метода инактивации радиацией) или 260 000 (определено биохимическими методами), коэффициент седиментации 9,2; этот компонент инактивируется протеазами, при нагревании и при обработке ионными детергентами (додецилсульфатом натрия). Часть натриевого канала, ответственная за связывание ТТХ или СТХ, построена, по крайней мере частично, из белка [14]. Молекулярная масса натриевого канала синапсом мозга равна в целом 320 000, что обусловлено присутствием двух небольших полипептидных цепей (37 000 и 39 000) и одной большой (260 000). Однако нельзя исключить, что другие молекулы, липиды или углеводы частично или полностью не участвуют в транспорте ионов Na^+ .

Ингибирование связывания ТТХ протеазой может быть ускорено при обработке мембраны сначала фосфолипазой, а затем нейраминидазой. Очевидно, ТТХ-связывающий компонент встроен в липидную мембрану и окружен углеводами.

Белковая природа натриевого канала доказана в опытах по блокированию натриевого тока реагентами [15], способными ковалентно связываться с функциональными группами белка (рис. 6.4), например солями ртути HgCl_2 и n -хлоромеркурибензоатом (рСМБ) или другими SH-реагентами: N -этилмалеимидом (NEM) и 5,5'-дитиобис(2-нитробензойной кислотой) (DNMB, реагент Элмана). Стимуляция нерва увеличивает эффективность действия SH-реагентов, возможно, потому, что реакционные группы белка становятся доступными лишь после открывания канала. Цистеин, меркаптоэтанол или дитиотреитол (ДТТ) могут снимать ингибирование солями ртути.

Наряду с SH-группами в натриевом канале, видимо, еще имеются дисульфидные связи, недоступные в мембранно-связанном виде, но способные восстанавливаться ДТТ после солюби-

лизации детергентом тритоном X-100. Восстановление связей S-S блокирует связывание ТТХ. Для более подробной характеристики натриевого канала необходимо разработать методы, селективно влияющие на каждый этап транспорта ионов. Перфузия внутренней части гигантского аксона кальмара протеолитическим ферментом проназой подавляет состояние инактивации натриевого канала и h -процесса (инактивации). Следова-

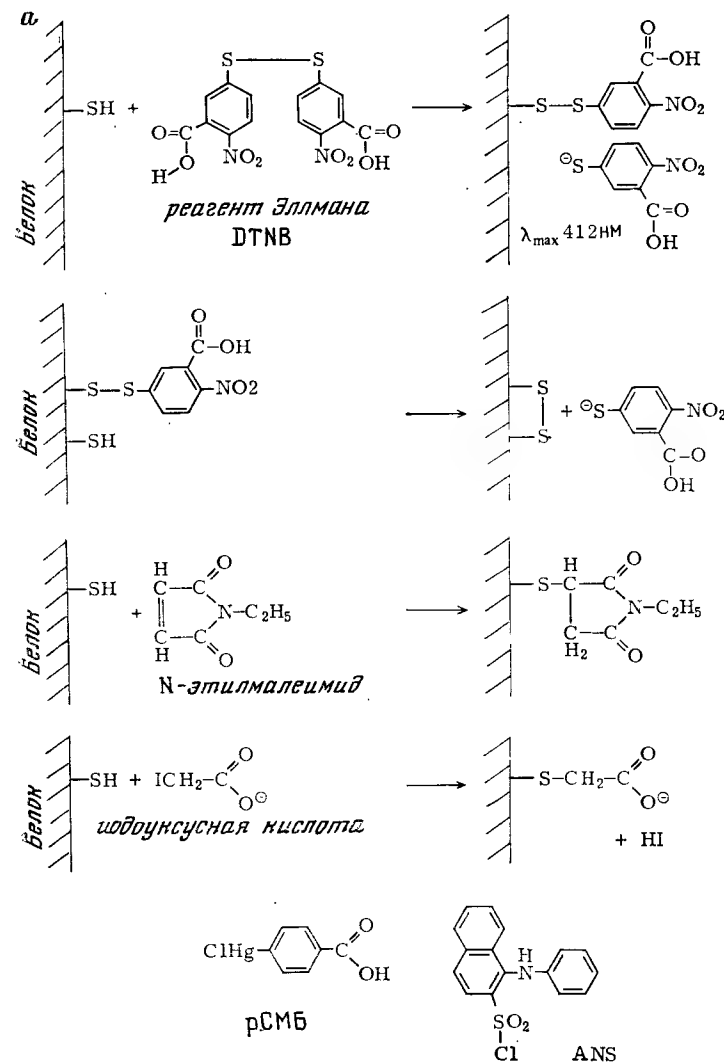


Рис. 6.4 (см. с. 144—145).

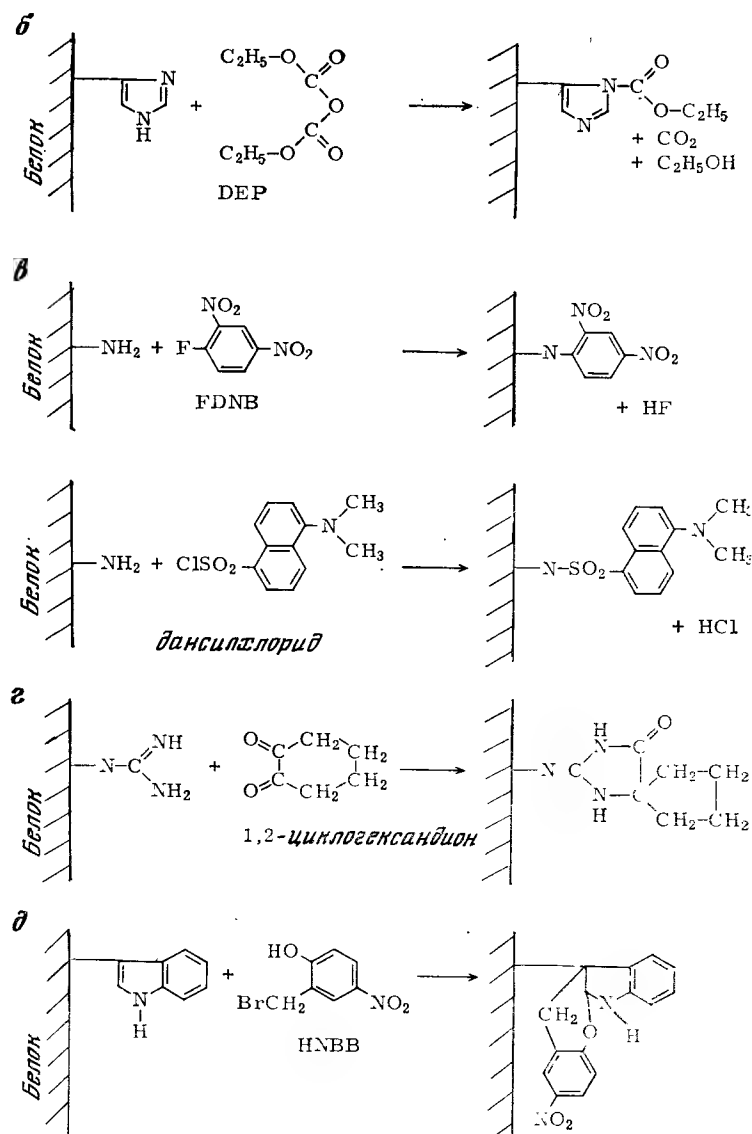


Рис. 6.4. (см. с. 145).

вательно, можно заключить, что в этом процессе участвует белок.

Методами генной инженерии была клонирована кДНК, комплементарная информационной РНК и кодирующая белок натриевого канала электрического угря (гл. 12). Данные по

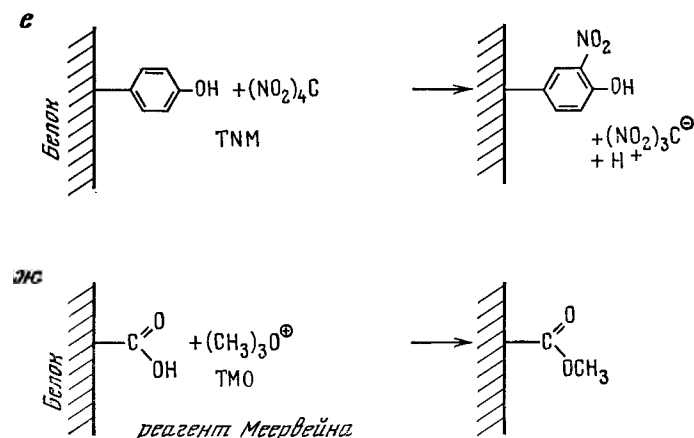


Рис. 6.4. Примеры некоторых специфических белковых реагентов, используемых при анализе белков мембраны нерва. *а* — SH-реагенты: 5,5'-дитиобис(2-нитробензойная кислота) (DTNB, реагент Элмана) реагирует с SH-группами посредством дисульфидного обмена с высвобождением окрашенных тиюфенолятных ионов ($\lambda_{\text{max}}=412$ нм); если рядом расположена еще SH-группа, происходит дальнейший дисульфидный обмен, приводящий к внутри- или межмолекулярным дисульфидным мостикам; N-этилмалеимид (NEM), иодоуксусная кислота, *п*-хлормеркурибензоат (*п*-ХМБ), а также ANS, применяемый для введения флуоресцирующей группы в белок; *б* — в белках имидазольные группы остатков гистидина реагируют с диэтилпиروкарбонатом (DEP); *в* — с аминогруппами реагирует предложенный Сенгером динитрофторобензол (FDNB) или флуоресцентный реагент дансилхлорид (5-диметиламино-1-нафталисульфохлорид); *г* — боковая цепь аргинина может быть модифицирована соединениями с двумя карбонильными группами подобно глиоксалу или 1,2-циклогександиону; *д* — индольная группа остатков триптофана взаимодействует с предложенным Кошландом 5-гидрокси-5-нитробензилбромидом (HNBB); *е* — фенольные группы остатков тирозина могут нитроваться тетранитрометаном (TNM); *ж* — реагент Меервейна для метилирования карбоксильных групп. Поскольку большинство вышеупомянутых реагентов взаимодействуют с белками по электрофильному механизму, их селективность определяется значением *рК* модифицируемой группы (об аффинных реагентах см. гл. 9).

первичной структуре показали, что кДНК содержит четыре повторяющихся гомологичных участка, причем каждый имеет кластер положительно заряженных аминокислот, принадлежащих, вероятно, воротному механизму. Для химического анализа компонентов канала в качестве других специфических инструментов использовались нейротоксины, более подробно на них мы остановимся в следующем разделе [16].

Влияние лекарственных препаратов на потенциал действия

Не пытаясь углубляться в область нейрофармакологии, рассмотрим действие лекарственных препаратов, которые могут

способствовать получению информации о структуре и функции возбудимой мембраны, а также обладающих важными свойствами для использования в медицине и фармакологии.

Нейротоксины как инструменты исследования ионных каналов

Тетродотоксин (ТТХ). В Японии ежегодно умирают люди, употребляющие в пищу рыбу фуга (*Tetrodontidae*), которая в стране считается деликатесом. Причины трагедии лежат в том, что при приготовлении у рыбы полностью не удаляют печень и яичники, а в них и содержится тетродотоксин (рис. 6.5). Этот токсин был также обнаружен у калифорнийского тритона *Taricha torosa*, а совсем недавно его нашли в икре лягушки *Atepolus chiriquensis* (Коста-Рико). С момента открытия тетродотоксин [17] стал одним из наиболее важных инструментов исследования потенциала действия. ТТХ специфично блокирует Na^+ -проводимость в мембране аксона, но не влияет ни на проводимость K^+ , ни на другие важные этапы в синаптической передаче: секрецию нейромедиатора из пресинаптической мембраны, образование нейромедиатора и ионную проницаемость постсинаптической мембраны. Действие ТТХ можно охарактеризовать следующим образом:

1. ТТХ действует только на внешней стороне мембраны аксона.

2. ТТХ уменьшает максимальную проводимость иона Na^+ , но не влияет на воротный механизм (m^3h в уравнении Ходжкин — Хаксли).

3. Действие ТТХ обратимо.

4. Взаимодействие ТТХ с натриевым каналом описывается стехиометрией 1:1, константа диссоциации равна $\sim 10^{-8}$ М.

5. Действие ТТХ не зависит от природы проникающего иона и от направления тока.

6. ТТХ эффективен при $\text{pH} < 8$, т. е. в одной из катионных форм (рис. 6.5) [18].

7. Небольшие модификации структуры ТТХ уменьшают его активность. Сравнение со структурой аналогично действующего сакситоксина (STX) показывает, что активность ТТХ связана с наличием гуанидиновой группы.

8. Эксперименты с ионами одно- и двухвалентных металлов показывают, что ТТХ влияет на металлсвязывающий центр ионного канала.

Сакситоксин (STX) — ядовитое вещество, которое иногда можно обнаружить у моллюска *Saxidomas giganteus* (Аляска). Этот моллюск питается микроорганизмами *Gonyaulax catenella*. Сакситоксин принципиально отличается от ТТХ по структу-

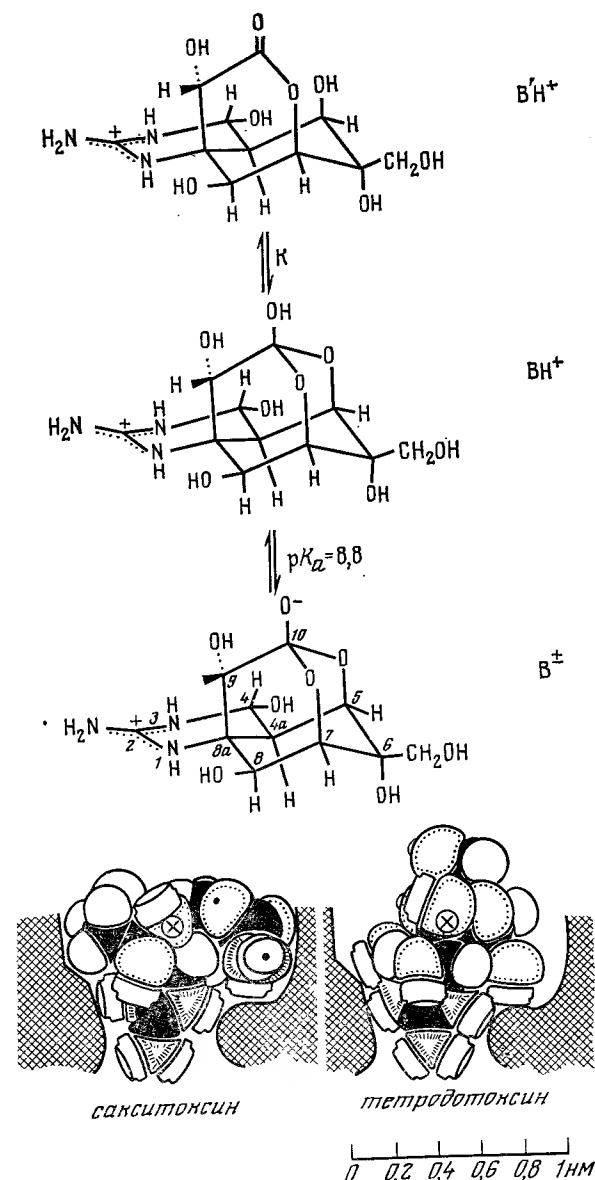


Рис. 6.5. Тетродотоксин. Токсичны только его катионные формы ($\text{pH} < 8$). Внизу — с помощью пространственных моделей ТТХ и STX показан предполагаемый механизм блокирования натриевого канала [18].

ре, но как и тетродотоксин содержит гуанидиновую группу в качестве функциональной (рис. 6.6). С натриевым каналом он соединяется в том же стехиометрическом соотношении 1:1, константа диссоциации $K_D = 7 \cdot 10^{-9}$ М. Что же касается фармакологических и физиологических свойств сакситоксина, то они напоминают действие ТТХ.

Токсины морской анемоны. Если ТТХ и СТХ действуют на максимальную натриевую проводимость $\bar{g}_{Na}$ и, таким образом, блокируют открытие ворот, то стрекательные клетки морской анемоны содержат яд, который тормозит активацию натриевого канала и оставляет ворота открытыми. Из *Anemonia sulcata* было выделено три различных токсина, анемотоксины I, II и III (АТХ I, АТХ II и АТХ III) [19]. Для этих токсинов были установлены структуры; построены они из небольших полипептидных цепей, содержащих по 46, 47 и 27 аминокислотных остатков соответственно. АТХ I и АТХ II в высшей степени гомологичны, в то время как АТХ III резко от них отличается. Пространственная структура АТХ I и АТХ II стабилизируется тремя дисульфидными связями, нарушение которых приводит к потере токсичности.

Эти токсины представляют большой интерес в качестве инструментов исследования при проведении биохимического анализа структуры канала, так как их связывающий центр отличается от связывающего центра ТТХ. Канал, стабилизируемый в открытом состоянии АТХ, тем не менее блокируется ТТХ; если последний отмывается, инактивация натриевого канала еще более замедляется под действием АТХ. Если оба токсина не просто замещают друг друга, напрашивается вывод о том, что ионная пора (g_{Na}) и воротный механизм (h — по уравнению Ходжкин — Хаксли) являются либо различными частями молекулы одного канала, либо отличаются полностью.

АТХ II связывается с перехватом Ранвье с константой диссоциации 10^{-5} М, а в случае взаимодействия с нервами ракообразных сродство на три порядка выше [20]. Интересно, что этот токсин действует только на внешней стороне мембраны, в то время как проназа влияет на процесс инактивации изнутри аксона (с. 145), что свидетельствует о локализации ворот на внутренней поверхности мембраны [21]. По-видимому, АТХ проникает довольно глубоко в мембрану; наличие в молекуле токсина длинных гидрофобных последовательностей подтверждает эту точку зрения.

Грайянотоксин (GTX), батрахотоксин (BTX), вератридин. Алкалоидные нейротоксины данной группы увеличивают проводимость мембраны для ионов Na^+ , т. е. снижают величину потен-

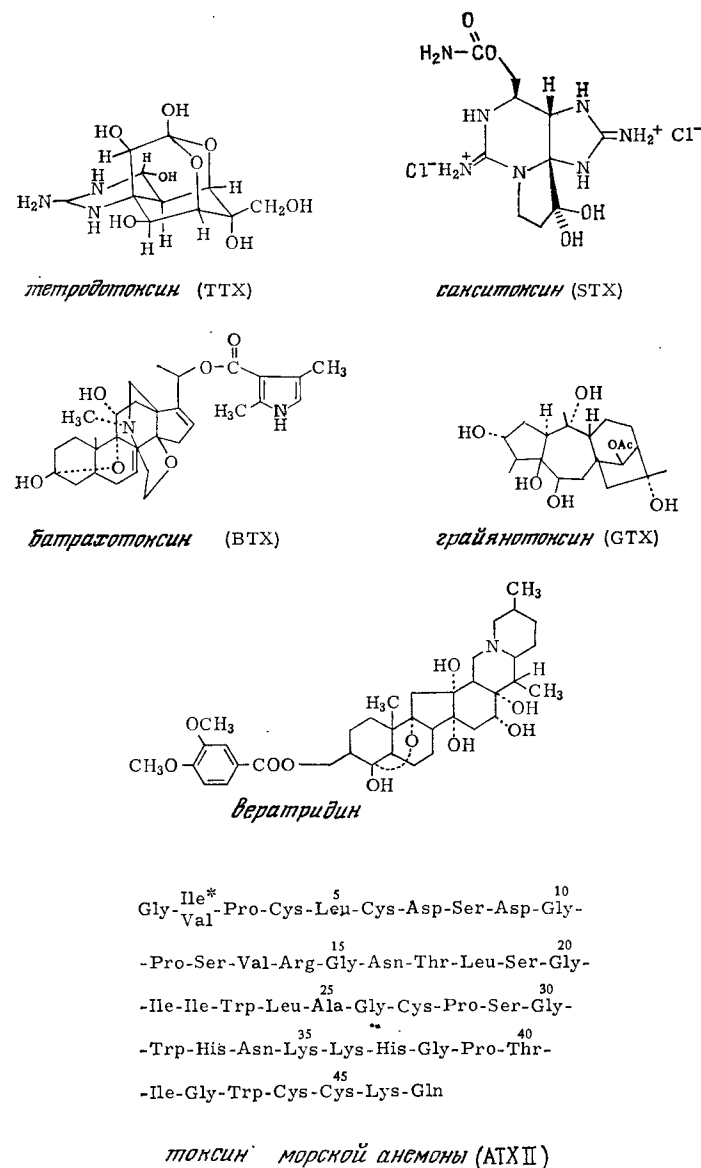


Рис. 6.6. Некоторые нейротоксины, влияющие на натриевую проницаемость возбудимых мембран.

циала покоя. ТТХ нейтрализует их действие при концентрациях на порядок выше той, которая необходима для блокирования натриевого канала. Эти данные могут быть обобщены при помощи модели двух состояний натриевого канала: как известно [22], канал может находиться в открытом и закрытом положениях; GTX, BTX и вератридин связываются открытым каналом, тем самым равновесие между двумя состояниями смещается в сторону открытой конфигурации.

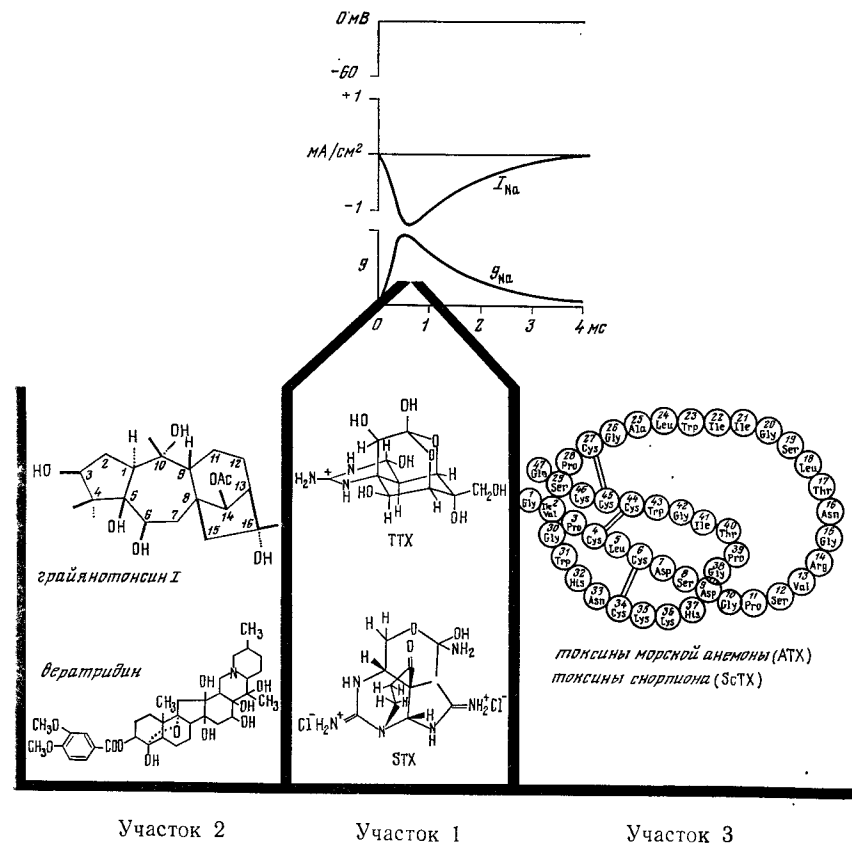
Кроме описанного действия GTX, BTX, вератридина, а также АТХ II на возбудимую мембрану, эти токсины стимулируют передачу химическими синапсами, что не является неожиданным, так как электрофизиологическими методами было показано, что секреция нейромедиатора ускоряется из-за деполяризации благодаря увеличению кальциевой проводимости пресинаптической мембраны.

Токсины скорпионов (ScTX). Яд скорпиона содержит несколько видов нейротоксинов. Они представляют собой мини-протеины, содержащие 65—66 аминокислотных остатков и четыре дисульфидные связи. Некоторые аминокислотные последовательности этих токсинов уже известны. Их действие менее избирательно. ScTX I способен одновременно ингибировать инактивацию натриевой и активацию калиевой проводимостей. Из некоторых видов *Centruroides* были выделены токсины, ряд из которых избирательно действует на активацию натриевого канала, а один из токсинов блокировал калиевую проводимость [23].

Нейротоксины как инструменты исследования. Во время потенциала действия выделяют три фармакологически различных процесса: активацию (открытие) канала, ионный транспорт через открытую пору и инактивацию (закрытие) канала. Нейротоксины, влияющие на потенциалзависимые натриевые каналы, по-видимому, действуют через три различных участка канала [14]: участок 1 (ТТХ, STX), относящийся к транспорту ионов; участок 2 (BTX, вератридин, аконитин), регулирующий активацию канала, и участок 3 (ScTX, АТХ), регулирующий инактивацию канала (табл. 6.4).

Так как эти токсины не конкурируют за общий центр связывания, для них предполагают существование независимых рецепторных участков. Вероятно, эти рецепторные участки входят в состав одной большой молекулы или даже нескольких различных молекул и расположены на некотором расстоянии друг от друга, поскольку токсины имеют значительный размер, а их центры связывания не перекрываются. С помощью радио-

Таблица 6.4. Участки натриевого канала, связывающие нейротоксины [14]. Участок 3, вероятно расположенный в той части натриевого канала, которая претерпевает конформационные изменения во время активации канала. Этот участок является сенсором напряжения и, возможно, входит в состав воротной структуры. (Формулу STX см. на с. 149)



Участок, связывающий токсин	Лиганд	Физиологический эффект
1	Тетродотоксин Сакситоксин	Блокирует транспорт Влияет на активацию и инактивацию
2	Батрахотоксин Вератридин Аконитин	Вызывает устойчивую активацию
3	Грайянтотоксин Токсин скорпиона Токсин морской анемоны	Ингибирует инактивацию Усиливает устойчивую активацию

Таблица 6.5. Анестетики

Анестетик	Формула	Концентрация, вызывающая блокировку нерва, моль/л
Неон	Ne	0,268
Закись азота (оксид диазота)	N ₂ O	0,128
Азот	N ₂	0,088
Этилен	C ₂ H ₄	0,052
Метанол	CH ₃ OH	2,4
Этанол	C ₂ H ₅ OH	0,5
Пропанол	C ₃ H ₇ OH	0,218
Нонанол	C ₉ H ₁₉ OH	6,4 · 10 ⁻⁵
Хлороформ	CHCl ₃	5,0 · 10 ⁻³
Диэтиловый эфир	C ₂ H ₅ OC ₂ H ₅	5,0 · 10 ⁻²
Галотан	F ₃ CCBrClH	5,0 · 10 ⁻³

активных производных токсинов могут быть выделены и биохимически охарактеризованы эти токсинсвязывающие молекулы.

Анестезия

Анестезия — обратимое снижение чувствительности к боли путем блокировки проводимости нерва. Обезболивающие средства, или анестетики, отличаются от вышеупомянутых токсинов (табл. 6.4) по вызываемому эффекту количественно (но не по качественному действию). Оба класса веществ дают полезную информацию относительно механизма нервной проводимости. Поэтому в случае расшифровки механизма их действия открываются возможности синтеза более эффективных и безопасных лекарственных средств.

Многообразие веществ и структур, блокирующих проводимость нервного импульса (рис. 6.7, табл. 6.4 и 6.5), так велико, что их действие не может быть описано лишь с помощью одного молекулярного механизма. Пока не предложена система классификации, все анестетики разделены на неспецифичные и специфичные.

Специфичные анестетики блокируют проведение импульса на определенных участках нервной системы там, где их структура узнается селективными рецепторами (например, опиатами) (рис. 6.7, б). Неспецифичные анестетики при определенной концентрации в крови насыщают липидный слой мембраны и таким образом осуществляют блок нейрональной проводимости. Многие препараты при разных концентрациях могут действовать или как специфичные, или как неспецифичные; следова-

Анестетик	Формула	Концентрация блокировки нерва, моль/л
а Прокаин (новокаин)		4,6 · 10 ⁻³
Тетракаин		
Лидокаин		
Хлорпромазин		1,0 · 10 ⁻⁵
Кокаин		2,6 · 10 ⁻³
Морфин		5,5 · 10 ⁻²
б		

Рис. 6.7. Анестетики. а — примеры анестетиков; б — анестетики блокируют проводимость либо посредством взаимодействия с липидной мембраной (справа), либо с мембранными белками (слева) при прямом блокировании ионных каналов.

тельно, разделение этих веществ на эти группы не очень удачно. В пределах каждой группы существует столько различных механизмов действия, что систематическая классификация невозможна без дальнейшего исследования. Однако следует подчеркнуть то обстоятельство, что анестетики способны блокировать аксональную проводимость и синаптическую передачу. В этой главе ограничимся обсуждением их влияния на аксон.

Эффективность вещества, блокирующего проводимость нерва, зависит от его растворимости в аксональной мембране [24]. Но основным требованием, как показано на примере газов-анестетиков, является то, что они должны захватываться межклеточной средой и переноситься к нерву. Таким образом, они должны быть растворимы в воде. Обезболивающий эффект, достигаемый с помощью этих средств, определяется главным образом коэффициентом распределения данного вещества между плазмой и мембраной. Кроме того, важное значение имеет также размер молекулы. Большие молекулы, подобные хлорпромазину, блокируют мембрану при более низких концентрациях, чем в случае маленьких молекул, таких как этанол. И наконец, не последнюю, хотя и не совсем ясную роль играет диаметр нервного волокна: волокна меньшего диаметра легче блокируются, чем более толстые. Поскольку волокна центральной нервной системы тоньше волокон периферической нервной системы, то при содержании этанола в сыворотке крови, равном 2%, организму обеспечено бессознательное состояние (общая анестезия), в то время как только при 4–5% этанола блокируются нервные импульсы периферических нервов (местная анестезия).

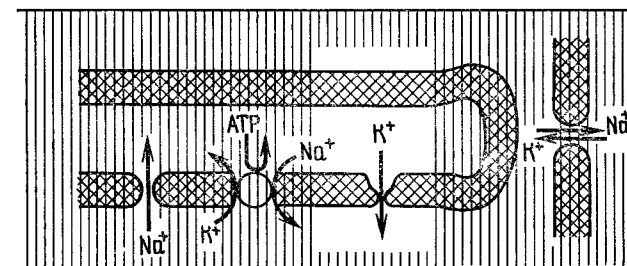
В гл. 3 уже упоминалось, что средства, используемые для местной анестезии, увеличивают текучесть липидной мембраны. Этот процесс сопровождается латеральным расширением мембраны, что, возможно, приводит к изменению ионных каналов с последующим блокированием нервного импульса. Местные анестетики селективно снижают натриевую проводимость $\bar{g}_{Na}$ и влияют на воротной механизм. Известно несколько гипотез, объясняющих их действие [25, 26]. Латеральное расширение может непосредственно изменить структуру натриевого канала. Однако эти же изменения могут быть обусловлены увеличением текучести мембраны: функциональная конформация ионных каналов стабилизируется жидкокристаллической средой липида, состояние которой может измениться под действием препарата.

Очевидно, что местные анестетики не только внедряются в липидную фазу мембраны [15]; они также непосредственно взаимодействуют с мембранными белками [16]. Так, анестетики могут влиять на АТРау, даже после ее экстракции из мем-

браны. Оказалось, что латеральное расширение мембраны, содержащей белок, в ~ 10 раз выше, чем расширение чисто липидной мембраны. Можно только догадываться об истинном значении этого фактора усиления; вероятно, это означает, что белок и липид вместе отвечают за анестезирующее действие многих веществ.

Проблема далее усложняется тем, что местные анестетики способны вызывать освобождение ионов кальция из аксональной мембраны, либо усиливают их связывание с ней. Так как ионы кальция влияют на порог возбуждения нервной и мышечной мембраны, следует рассматривать его эффект при описании механизма действия анестетиков. Четвертичные положительно заряженные амины, например прокаин и хлорпромазин, замещают Ca^{2+} , тогда как отрицательно заряженные барбитураты и ряд других незаряженных анестетиков увеличивают связывание Ca^{2+} с мембраной.

Калиевый канал



На рис. 6.1 приведены временные характеристики калиевого тока во время деполяризации, который в отличие от натриевого тока идет в обратном направлении и не имеет механизма инактивации, т. е. калиевый канал остается открытым в течение всего процесса деполяризации. Ходжкин и Хаксли описали изменение калиевой проводимости g_K уравнением

$$g_K = \bar{g}_K n^4$$

$\bar{g}_K$ — максимальная проводимость мембраны по K^+ на единицу поверхности мембраны. По аналогии с величинами m и h в уравнении натриевой проводимости здесь n — безразмерная переменная, характеризующая кинетику активации канала по калию. Таким образом,

$$\frac{dn}{dt} = \alpha_n(1 - n) - \beta_n n$$

Воротные токи для калиевого канала пока еще не измерены, тем не менее можно предположить, что в нем также существуют воротный механизм и селективный фильтр. Подобно натрие-

Таблица 6.6. Относительная проницаемость натриевого канала для различных ионов

Ион	Радиус иона, нм	$P_{\text{ион}}/P_K$
Литий	0,120	0,018
Натрий	0,190	0,010
Калий	0,266	1,00
Таллий	0,280	2,3
Рубидий	0,296	0,91
Аммоний	0,30	0,13
Гидразиний	0,33	0,029
Цезий	0,338	0,077
Метиламмоний	0,36	0,021
Формаидий	0,36	0,020
Гуанидиний	0,48	0,013

вому каналу, проницаемость аксональной мембраны не коррелирует с ионным радиусом (табл. 6.6).

Эксперименты по блокированию солями четвертичного аммония позволили получить более точные данные о структуре и свойствах обеих функций калиевого канала. Ионы тетраэтил-аммония (ТЭА) блокируют выходящий калиевый ток. В гигантском аксоне кальмара подобный эффект наблюдался только при попадании ТЭА внутрь нервного волокна во время перфузии аксона. Отсюда следует, что канал пронизывает мембрану асимметрично. Еще более интересно то [27], что блокирующая способность ионов четвертичного аммония увеличивается при замене одной из этиловых групп более длинной гидрофобной боковой цепью (рис. 6.8). Эти производные не просто блокируют, они инактивируют уже начавшийся калиевый ток (рис. 6.9), как бы проникая в открытый канал.

Хотя диаметр иона ТЭА близок с размером гидрированного иона калия, ТЭА не может проходить через мембрану. Поэтому можно сделать вывод, что калий способен проникать через канал только в несольватированной форме, а ТЭА не способен уменьшить свой эффективный диаметр без удаления алкильных групп. Поскольку он блокирует проницаемость для ионов калия только при попадании внутрь аксона, то, следовательно, «интерьер» канала должен иметь воронкообразную форму, чтобы как ТЭА, так и гидратированный K^+ могли связываться в канале (рис. 6.10); диаметр воронки $\sim 0,8$ нм.

В связи с тем что соль тетраалкиламмония не просто блокирует калиевый ток, а вызывает инактивацию, ТЭА, вероятно, может входить в воронку только открытого канала при стимуляции нерва. Воротный механизм, по-видимому, располагается

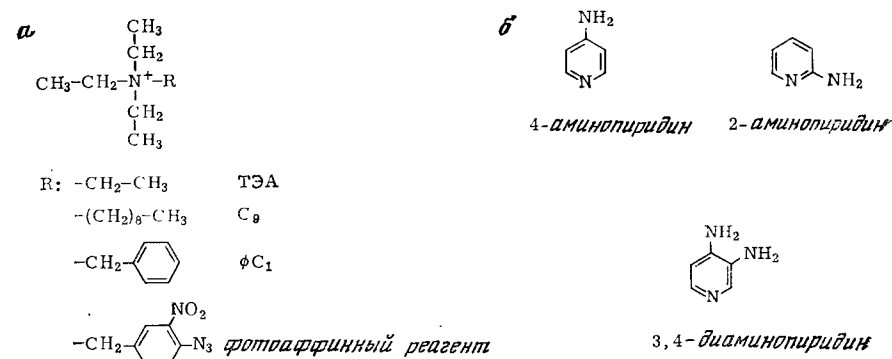


Рис. 6.8. Специфические ингибиторы калиевой проницаемости возбудимой мембраны. а — производные тетраэтил-аммония (ТЭА); б — аминопиридины.

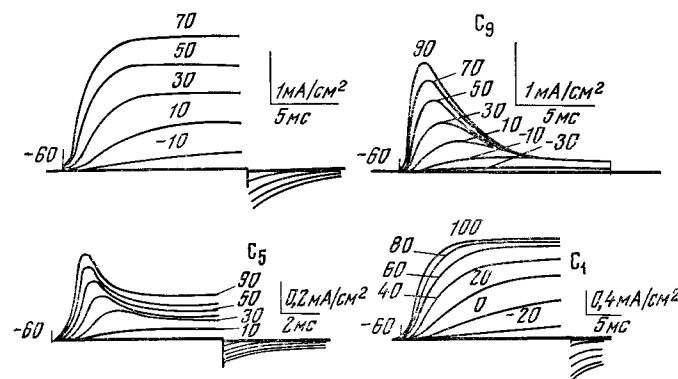


Рис. 6.9. Временная зависимость калиевого тока, проходящего через мембрану аксона после деполяризации при различных величинах потенциала. Вверху слева — контроль без ингибитора; остальные — ингибирование тока ионов калия производными ТЭА. Блокирование увеличивается при замещении этиловой группы ТЭА гидрофобной боковой цепью (C_9 — нонил, C_5 — пентил, C_1 — метил); калиевый ток вначале увеличивается, затем ингибируется C_5 - и C_9 -производными (инактивация); следовательно, эти реагенты блокируют вход в открытый канал.

на внутренней стороне мембраны вблизи воронки (рис. 6.10). Можно выделить следующие особенности калиевого канала [28]:

1) воротный механизм локализован на внутренней стороне мембраны;

2) в канале имеется своеобразная воронка делающая возможным после открытия ворот вход гидратированного иона калия и тетраалкиламмония (диаметр воронки $\sim 0,8$ нм);

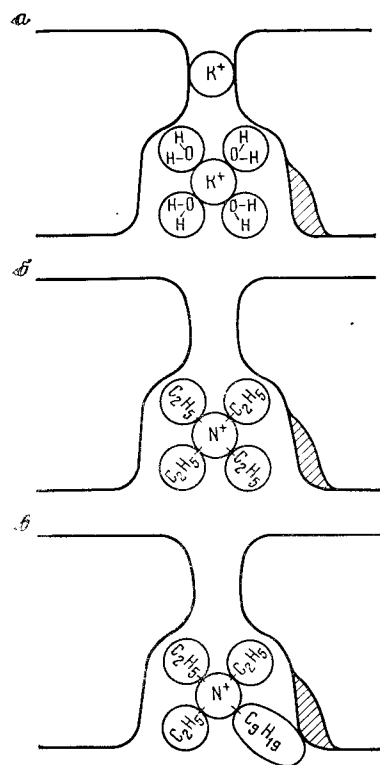


Рис. 6.10. Модель калиевого канала. а — воронкообразное расширение вмещает сольватированный ион; селективный фильтр пропускает только десольватированный ион; б — ТЭА входит в воронку и блокирует канал, но не может проникнуть через фильтр; в — блокирующее действие усиливается гидрофобной боковой цепью, взаимодействующей с гидрофобной областью (выделена) в воронке канала. Воротный механизм, закрывающий воронку, не изображен.

3) существует селективный фильтр, пропускающий гидратированный ион калия, но не ион ТЭА (диаметр $\sim 0,3$ нм);

4) имеется гидрофобный участок, взаимодействующий с одной из боковых цепей ионов тетраалкиламмония и усиливающий их связывание.

На рис. 6.10 представлена особая модель, имитирующая работу гигантского аксона кальмара. В перехвате Ранвье седалищного нерва лягушки ТЭА способен проявлять ингибирующий эффект с обеих сторон мембраны. Поэтому калиевый канал в этом случае должен иметь воронкообразные расширения с двух сторон. Однако и здесь инактивация наблюдается только изнутри аксона. Следовательно, воротный механизм в миелинизированных волокнах тоже располагается на внутренней стороне мембраны.

Другие блокаторы, например 4-аминопиридин и 3,4-диаминопиридин [29], даже в гигантском аксоне кальмара ингибируют калиевый ток с обеих сторон мембраны. Вероятно, аминопирдин связывается с закрытым каналом.

«Гидрофобная зона» воронки, возможно, состоит из липидов. Эту зону можно идентифицировать с помощью фотоаффинного реагента (рис. 6.8): производного ТЭА, который способен активироваться при освещении с об-

разованием ковалентной связи с центром связывания.

Некоторые физические свойства калиевого канала

Температурный коэффициент, как и у натриевого канала, равен 1,3, что соответствует энергетическому барьеру 17 кДж/моль.

Шумовой анализ в гигантском аксоне кальмара выявляет проводимость одиночного канала, равную $12 \cdot 10^{12}$ Ом⁻¹, что в три раза выше, чем у натриевого канала [30]. Те же измерения показали, что плотность натриевых каналов на единицу площади мембраны в пять раз выше, чем плотность калиевых. Если допустить, что открывание канала осуществляется по принципу «все или ничего», продолжительность открывания одиночного канала равна 1 мс. Вероятно, каналы не взаимодействуют между собой.

Биохимическая характеристика калиевого канала

При изучении связывания ТЭА с калиевым каналом выяснено, что константа диссоциации образующегося комплекса равна 0,4 ммоль/л. Поэтому ТЭА практически невозможно использовать для тестирования хода выделения и биохимического исследования молекул калиевого канала. В связи с этим калиевые каналы изучены в меньшей степени, чем натриевые каналы. Однако, по-видимому, можно использовать производные ТЭА (рис. 6.8), которые как более гидрофобные вещества имеют значительно более низкую константу диссоциации. Для радиоактивного мечения, последующей очистки и структурного анализа еще лучше использовать производные, способные образовывать ковалентные связи с компонентами калиевого канала. Такое производное — фотоаффинный реагент 4-азидо-2-нитробензилтриэтиламмонийтетрафтороборат, который селективно и необратимо реагирует с калиевым каналом.

С помощью специфических реагентов на белки, например динитрофторобензола (ДНФБ), взаимодействующего с аминокетонами, удалось доказать белковую природу компонентов калиевого канала. pH-зависимость калиевой проницаемости предполагает наличие в канале группы с pK 6,3 (ракообразные) или 5,2 (лягушка), которая представляет собой имидазол гистидинового остатка. В пользу этого свидетельствуют результаты по селективному блокированию калиевой проводимости диэтилпироксикарбонатом (ДЭП), специфичным реагентом на имидазол (рис. 6.4).

Структура аксональной мембраны. Биохимия, электронная микроскопия, спектроскопия

Натриевые и калиевые каналы составляют только незначительную часть аксональной мембраны. Лаздунский [31] рассчитал, что в нерве ракообразных лишь одна тысячная часть полипептидных цепей принадлежит компонентам каналов. В гл. 7 подробно рассматривается система активного транспорта, здесь

же мы хотим обратить внимание на то, что в мембране преобладают АТРазная и ацетилхолинэстеразная ферментативные активности. В то время как АТРаза имеет четко определенную функцию как компонент натриево-калиевого насоса, роль ацетилхолинэстеразы неясна. Нахмансон [32] выдвинул гипотезу о том, что генерация потенциала действия и синаптическая передача имеют одинаковый механизм и что ацетилхолин в обоих случаях играет главную роль, так как является нейромедиатором в многочисленных синапсах. Идентификация в аксональной мембране связывающих центров для синаптического агониста никотина подтвердила эту гипотезу. Однако были обнаружены и аксоны без подобных связывающих центров. Кроме того, такие типичные блокаторы синаптической передачи, как токсины кобры, не оказывали никакого действия на механизм генерации потенциала действия. Известно также, что существуют чисто хемовозбудимые постсинаптические мембраны, в то время как аксональная мембрана является электровозбудимой. Хотя, несомненно, гипотеза Нахмансона оказала влияние на развитие нейробиологических исследований, сегодня ее нельзя считать правильной, а роль ацетилхолинэстеразы в мембране аксона все еще остается тайной.

Потенциал действия гигантского аксона кальмара может быть охарактеризован с помощью теории Ходжкин и Хаксли, допускающей существование только двух типов каналов: калиевых и натриевых, зависящих от потенциала и времени. Представленные ниже факты свидетельствуют, что данное допущение в ряде случаев не соответствует действительности. Так, в перехвате Ранвье у позвоночных потенциал действия генерируется без участия потенциалзависимых калиевых каналов. В то же время эта теория не рассматривает другие виды проводимости, которые найдены в некоторых возбудимых мембранах позвоночных; в симпатических нейронах лягушки-быка и моллюсков были найдены кальцийактивируемый калиевый канал и потенциалчувствительный кальциевый канал (который не следует путать с кальциевым током, проходящим через натриевый канал).

Подобные каналы необязательно должны быть функционально идентичными в различных клетках и у разных организмов. Клеточные мембраны сердечной мышцы, например, содержат потенциалзависимый натриевый канал, нечувствительный к ТТХ! Дальнейшую информацию по этому вопросу можно найти в обзоре [33].

Кроме уже упомянутых ферментов, в аксональной мембране обнаружена большая группа сократительных белков, подобных актину, миозину, тропомиозину, а также молекулы, напоминающие тубулин. Однако общее содержание белка в данной

мембране значительно меньше, чем в других клеточных мембранах.

При изучении мембраны аксона методом электронной микроскопии практически нет возможности обнаружить какие-либо компоненты, участвующие в потенциале действия. При средней плотности 50 каналов на 1 мкм^2 на каждый канал приходится тысячи других белков и более миллиона липидных молекул. На электронных микрофотографиях видна необычная триламнарная структура толщиной $\sim 8,5 \text{ нм}$. Перакчия [34] методом

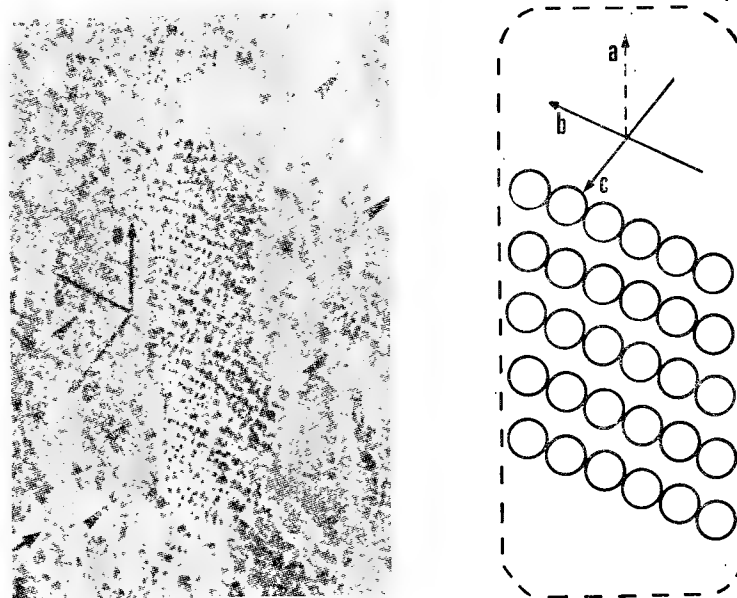


Рис. 6.11. Электронная микрофотография аксона речного рака. На фотографии виден линейный отпечаток, на котором глобулярные частицы образуют параллельные цепи. Функция этих структур неизвестна. Вероятно, они могут быть связаны: а) с возбуждением мембраны, б) с обменом веществ между аксоном и окружающей средой, в) с межклеточной адгезией. (Воспроизводится с разрешения Perachia.) [34].

замораживания — скалывания в аксонах рака обнаружены участки, содержащие упорядоченные глобулярные структуры с неизвестной функцией (рис. 6.11).

Генерация нервного импульса представляет собой динамический процесс, сопровождающийся структурными изменениями в возбудимой мембране. Эти изменения проявляются как изменения ионной проницаемости, а также реакционной способности функциональных групп к специфичным реагентам. Мы

упомянули ускорение реакции с SH-реактантами при нервном возбуждении. Л. Б. Коев [35] предложил методы обнаружения структурных изменений, с помощью которых удалось установить, что двойное лучепреломление и светорассеяние мембраны в процессе возбуждения менялись. В то же время объем возбужденного аксона возрастал. Однако неизвестно, сопровождается ли генерация действия изменением таких параметров аксона, как УФ-поглощение или флуоресценция. В то же время параметры флуоресценции мероцианина (красителя, введенного в аксон) имеют ту же временную зависимость, что и мембранный потенциал при прохождении нервного импульса (рис. 6.12) [35, 36]. Возможно, этот метод дает лишь косвенную информацию о молекулярных процессах в возбудимой мембране, но тем не менее в тех случаях, когда электрофизические измерения невозможны, оптические методы предоставляют более широкие экспериментальные возможности для измерения мембранных потенциалов.

Мероцианин относится к группе так называемых потенциалзависимых красителей. Изменение поглощения таких веществ в зависимости от приложенного потенциала объясняется особенностями структуры красителя. Молекула красителя может вытесняться электрическим полем из мембраны. При этом изменение поглощения обусловлено тем, что величины поглощения хромофора в липидном окружении мембраны в водной среде клетки отличаются между собой. Если речь идет о красителе, молекула которого обладает дипольным моментом, на его ориентацию и, следовательно, поглощение света влияет приложенный потенциал.

Потенциалзависимые красители могут быть полезными и для контроля изменений потенциала в органеллах или везикулах, слишком малых для использования микроэлектродной техники. С этой же целью могут применяться липофильные катионы, например тетрафенилфосфоний или трифенилметилфосфоний (ТФМФ^+), накопление которых в мембранных системах зависит от приложенного потенциала.

Выводы

Каналы пассивного транспорта ионов, проходящих через возбудимые мембраны, содержат два функциональных компонента: воротный механизм и селективный фильтр. Воротный механизм, способный открывать или закрывать канал, может быть активирован электрически путем изменения мембранного потенциала или химически, например в синапсе, связыванием с молекулой нейромедиатора. Селективный фильтр имеет такие размеры и такое строение, которые позволяют пропускать ли-

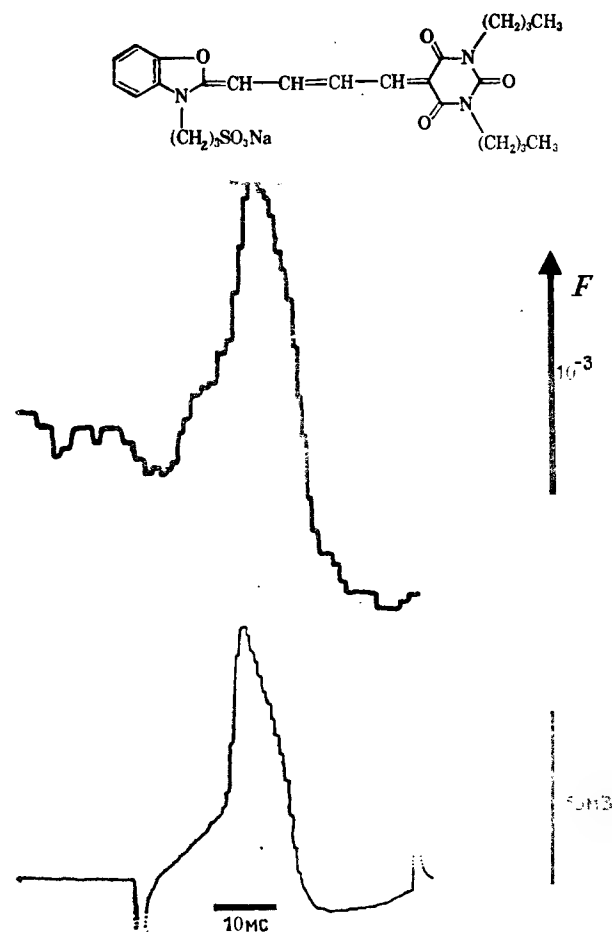


Рис. 6.12. Применение оптических методов для исследования потенциала действия. Изменения флуоресценции мероцианина (вверху) соответствуют изменению мембранного потенциала (внизу).

бо задерживать различные ионы. Ионный транспорт через канал представляется не просто в виде диффузии, а скорее как цепь отдельных стадий, энергия активации которых характеризует скорость транспорта: среди таких стадий можно выделить связывание ионов с молекулами канала, десольватацию, сольватацию и диссоциацию ионов по другую сторону мембраны.

Многочисленные нейротоксины влияют на пассивный ионный транспорт через мембрану аксона. Поскольку они влияют на

различные фазы транспорта, они могут быть подходящими инструментами для анализа мембранных молекул, принимающих участие в этом процессе. GTX и BTX оказывают действие на активацию натриевого канала, TTX и STX уменьшают проводимость канала, не влияя на воротный механизм, ATX и некоторые токсины скорпиона блокируют инактивацию, т. е. предотвращают закрывание натриевого канала.

Анестетики — весьма неоднородные вещества с различными механизмами и мишенями действия — могут оказывать влияние на генерацию и проведение импульса как посредством блокирования воротного механизма, так и воздействия на максимальную проводимость $\bar{g}_{Na}$ каналов.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- Hodgkin A. L., Huxley A. F., Current carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of *Loligo*, *J. Physiol.*, **116**, 449—472 (1952).
- Hodgkin A. L., Huxley A. F., The component of membrane conductance in the giant axon of *Loligo*, *J. Physiol.*, **116**, 473—496 (1952).
- Hodgkin A. L., Huxley A. F., Quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve, *J. Physiol.*, **117**, 500—544 (1952).
- Pfenniger K. H., Organization of neuronal membranes, *Ann. Rev. Neurosci.*, **1**, 445—472 (1978).
- Keynes R. D., Rojas E., Characteristics of the sodium gating current in squid giant axon, *J. Physiol.*, **223**, 28P (1978).
- Armstrong C. M., Benzanilla F., Currents related to movements of the gating particles of the sodium channel, *Nature*, **242**, 459—460 (1973).
- Hille B., Gating in sodium channels of nerve, *Ann. Rev. Physiol.*, **38**, 139—152 (1976).
- Keynes R. D., Organization of the ionic channels in nerve membranes. In: *The Nervous System*, Vol. 1, D. B. Tower (ed.), Raven Press, New York, 1975.
- Rojas E., Bergmann C., Gating currents: molecular transition associated with the activation of sodium channels in nerve, *TIBS*, **2**, 6—9 (1977).
- Hille B., Ionic selectivity of Na and K channels of nerve membranes. In: *Membranes*, G. Eisenmann (ed.), Marcel Dekker Inc., New York, 1975.
- Hille B., Ionic selectivity, saturation, and block in sodium channels. A four-barrier model, *J. Gen. Physiol.*, **66**, 535—560 (1975).
- Läuger P., Kinetic properties of ion carriers and channels, *J. Membrane Biol.*, **57**, 163—178 (1980).
- Ritchie J. M., Rogart R. B., Density of sodium channels in mammalian myelinated nerve fibres and nature of the axonal membrane under the myelin sheath, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 211—215 (1977).
- Catterall W. A., The emerging molecular view of the sodium channel, *TINS*, **5**, 303—306 (1982).
- Sigworth F. J., Spalding B. C., Chemical modification reduces the conductance of sodium channels in nerve, *Nature*, **283**, 293—295 (1980).
- Narahashi T., Chemicals as tools in the study of excitable membranes, *Physiol. Rev.*, **54**, 813—889 (1974).
- Narahashi T., Deguchi T., Urakawa N., Ohkubo Y., Stabilization and rectification of muscle fibre membrane by tetrodotoxin, *Am. J. Physiol.*, **198**, 934—938 (1960).

- Narahashi T., Moore J. W., Frazier D. T., Dependence of tetrodotoxin blockage of nerve membrane conductance on external pH, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **169**, 224—228 (1969).
- Beress L., Beress R., Wunderer G., Isolation and characterization of three polypeptides with neurotoxic activity from *Anemonia sulcata*, *FEBS Letters*, **50**, 311—314 (1975).
- Bergman C., Dubois J. M., Rojas E., Rathmayer W., Decreased rate of sodium conductance inactivation in the node of Ranvier induced by a polypeptide toxin from sea anemone, *Biochim. Biophys. Acta*, **455**, 173—184 (1976).
- Rojas E., Rudy B., Destruction of the sodium conductance inactivation by a specific protease in perfused nerve fibres from *Loligo*, *J. Physiol.*, **262**, 501—531 (1976).
- Catterall W., Activation of the action potential Na^+ ionophore by neurotoxins, *J. Biol. Chem.*, **252**, 866—867 (1977).
- Carbone E., Wanke E., Prestipino G., Possani L. D., Maelicke A., Selective blockage of voltage-dependent K^+ channels by a novel scorpion toxin, *Nature*, **296**, 90—91 (1982).
- Seeman P., The actions of nervous system drugs on cell membranes. In: *Cell Membranes*, Weissmann G., Claiborne R. (eds.), H. P. Publishing Co., New York, 1975.
- Lee A. G., Model for action of local anaesthetics, *Nature*, **262**, 545—548 (1976).
- Richards C. D., Martin K., Gregory S., Keightley C. A., Hesketh T. R., Smith G. A., Warren G. B., Metcalfe J. C., Degenerate perturbations of protein structure as the mechanism of anaesthetic action, *Nature*, **275**, 775—779 (1978).
- Armstrong C. M., Interaction of tetraethylammonium ion derivatives with the potassium channels of giant axons, *J. Gen. Physiol.*, **58**, 413—437 (1971).
- Armstrong C. M., Potassium pores of nerve and muscle membranes. In: *Membranes*, G. Eisenmann (ed.), Marcel Dekker Inc., New York, 1975.
- Kirsch G. E., Narahashi T., 3,4-Diaminopyridine. A potent new potassium channel blocker, *Biophys. J.*, **22**, 507—512 (1978).
- Conti F., de Felice J. L., Wanke E., Potassium and sodium ion current noise in the membrane of the squid giant axon, *J. Physiol. (London)*, **248**, 45—82 (1975).
- Balerna M., Fosset M., Chicheportiche R., Romey G., Lazdunski M., Constitution and properties of axonal membranes of crustacean nerves, *Biochemistry*, **14**, 5500—5511 (1975).
- Nachmansohn D., Neumann E., Chemical and Molecular Basis of Nerve Activity, Academic Press, New York, 1975.
- Adams P., Voltage-dependent conductance of vertebrate neurons, *TINS*, **5**, 116—119 (1982).
- Peracchia C., Excitable membrane ultrastructure: I. Freeze fracture of crayfish axons, *J. Cell Biol.*, **61**, 107—122 (1974).
- Cohen L. B., Salzberg B. M., Grinvald A., Optical methods for monitoring neuron activity, *Ann. Rev. Neurosci.*, **1**, 171—182 (1978).
- Salzberg B. M., Obaid A. L., Senseman D. M., Gainer H., Optical recording of action potentials from vertebrate nerve terminals using potentiometric probes provides evidence for sodium and calcium components, *Nature*, **306**, 36—40 (1983).

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА

- Chang D. F. C., Tasaki I., Adelman W. J., Leuchtag H. R. (eds.), *Structure and Function in Excitable Cells*, Plenum Press, New York and London, 1983.
- Reichardt L. F., Kelly R. B., A molecular description of nerve terminal function, *Ann. Rev. Biochem.*, **52**, 871—926 (1983).

- Hucho F., Ovchinnikov Yu. (eds.), *Toxins as Tools in Neurochemistry*, De Gruyter, Berlin 1983.
- Marty A., Ca^{2+} -dependent K^+ channels with large unitary conductance, *TINS*, 6, 262—265 (1983).
- Hille B., *Ionic Channels of Excitable Membranes*, Sinauer Associates, Massachusetts, 1984.
- Adams P., Voltage-dependent conductance of vertebrate neurons, *TINS*, 5, 115—119 (1982).
- Kostyuk P. G., Calcium channels in the neuronal membrane, *Biochim. Biophys. Acta*, 650, 128—150 (1981).
- См. также работы [7, 12, 14, 16, 24, 26, 33, 35] в разд. «Цитированная литература».

АКТИВНЫЙ ТРАНСПОРТ ИОНОВ

В гл. 6 рассматривались натриевые и калиевые каналы, регулирующие пассивный ток ионов во время потенциала действия (рис. 7.1). Однако еще одна функция аксональной мембраны связана с проведением нервных импульсов — активный транспорт ионов. Если бы вход ионов натрия в клетку сопровождался только выходом ионов калия, градиент концентрации между обеими сторонами клетки вскоре исчез. Пассивное проникновение ионов Na^+ через мембрану в состоянии покоя приводит к тому же эффекту, поэтому входящие ионы натрия должны вновь выводиться наружу, а диффундирующие снаружи ионы K^+ должны направляться внутрь аксона. Естественно, что для этого должна расходоваться энергия, поскольку указанный процесс осуществляется против градиента концентрации. Именно этой цели и служат ионные насосы, содержащиеся в мембране аксона; благодаря метаболической энергии, накопленной в АТР, они осуществляют активный транспорт ионов для поддержания мембранного потенциала. Направление движения иона и направления градиентов схематически изображены на рис. 7.2. Ходжкин и Кейнес [1] исследовали активный транспорт ионов Na^+ через мембрану нерва. Они показали, что поток радиоактивных ионов Na^+ из клетки ингибируется 2,4-динитрофенолом (рис. 7.3, а), который блокирует синтез АТР. В ходе дальнейших экспериментов Ходжкин и Кейнес установили, что транспорт Na^+ обеспечивается при участии ферментов (рис. 7.3, б). Охлаждение клетки до $9,8^\circ\text{C}$ (или до $0,5^\circ\text{C}$) явно замедляло выход ионов натрия, хотя известно, что пассивная диффузия Na^+ не столь сильно зависит от температуры.

Опровергает ли этот факт, принятую ранее точку зрения о том, что в гигантском аксоне кальмара возможно высвобождение многочисленных потенциалов действия при замене аксоплазмы на простые солевые растворы (гл. 5)? Очевидно, сокращение энергетического запаса должно влиять на мембранный потенциал. Этот парадокс можно разрешить простым расчетом: во время потенциала действия $\sim 5 \cdot 10^{-12}$ моль K^+ проходит через 1 см^2 поверхности аксона. Концентрация ионов K^+ в аксо-

плазме равна $\sim 0,5$ моль/л. Итак, в аксоне диаметром 0,5 мм количество ионов K^+ составляет 10 мкмоль/см² поверхности, что в $2 \cdot 10^6$ раз больше, чем изменение концентрации K^+ в течение одного потенциала действия; другими словами, 1000 импульсов потенциала действия меняют концентрацию калия только на 0,05%.

Таким образом, нейрон мог бы существовать без работы ионных насосов лишь некоторое время, затем эта клетка погибла бы не только из-за уменьшения концентрации K^+ внутри, но и в результате резкого повышения концентрации K^+ снаружи.

В гл. 1 отмечалось, что накопление ионов K^+ в ближайшем окружении клетки снижает возбудимость аксона и может привести к самопроизвольному возникновению нервного импульса;

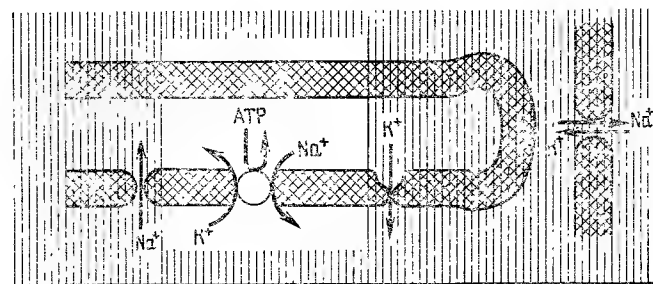


Рис. 7.1.

возможно, это и есть одна из причин эпилептического припадка. В гл. 1 уже рассматривалась роль глиальных клеток, которые контролируют концентрацию K^+ снаружи и, следовательно, влияют на возбудимость соседних аксонов.

Так или иначе, активный транспорт поддерживает концентрации Na^+ и K^+ . АТФ (топливо, необходимое для работы ионного насоса) играет важную роль, связывая клеточный метаболизм с проводимостью нервного импульса.

Далее сможем убедиться, что Na^+ , K^+ -насос — это единственная молекулярная система, поддерживающая градиенты концентраций ионов натрия и калия.

Три примера АТФ-зависимых ионных насосов

Важная роль активного транспорта ионов заключается не только в поддержании мембранного потенциала на возбудимых мембранах. В равной степени функция нервной клетки зависит не только от мембранного потенциала (см. уравнение Нернста

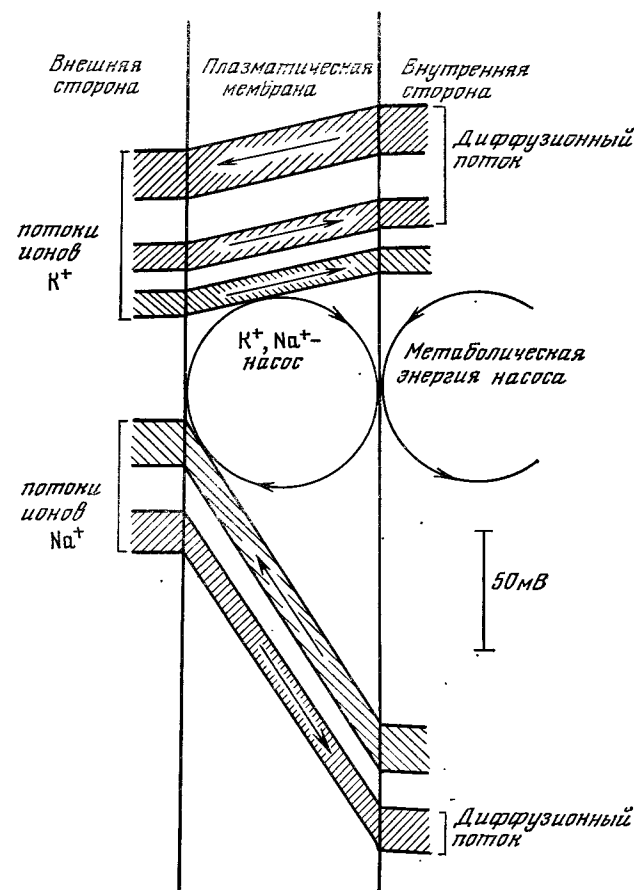


Рис. 7.2. Схематическое изображение ионных потоков (для K^+ и Na^+) через возбудимую мембрану в состоянии покоя. Пассивные диффузионные потоки частично совпадают с электрохимическим градиентом (поток Na^+ — внутрь, поток K^+ — наружу), а активный транспорт, обусловленный специфическим ионным насосом, частично направлен против градиента (Na^+ — наружу, K^+ — внутрь). Диффузионные потоки и работа насоса выделены в виде заштрихованных зон; соответствующая ширина каналов свидетельствует о величине потока, а их наклоны — о электрохимических градиентах. Диффузионные токи резко возрастают во время активности [16].

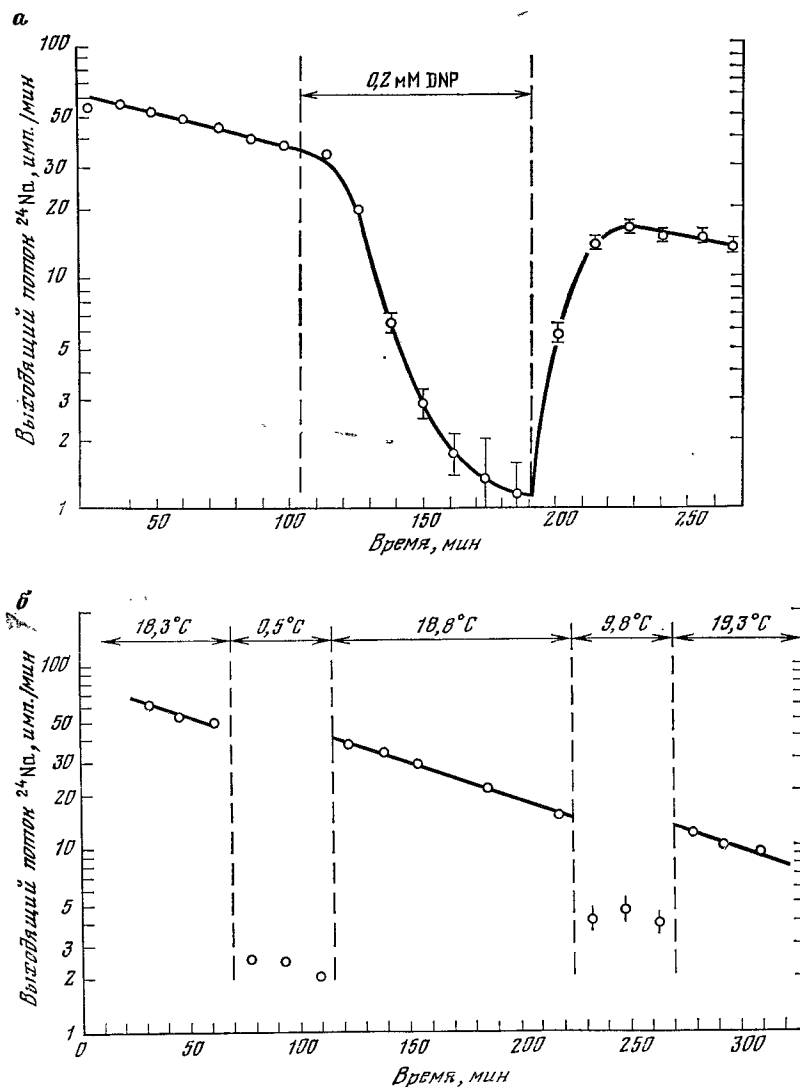
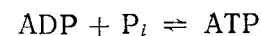


Рис. 7.3. Активный транспорт ионов натрия. а — транспорт радиоактивных ионов блокирован 2,4-динитрофенолом, ингибитором синтеза АТФ; б — охлаждение до 0,5°C или 9,8°C замедляет выходящий натриевый поток, это свидетельствует о том, что натриевый транспорт осуществляется ферментом и не является диффузионным процессом. (Воспроизводится с разрешения авторов и Journal of Physiology.) [1].

в гл. 5). Как и в большинстве других клеток, здесь осуществляются различные энергетически зависимые транспортные процессы, обеспечивающие совсем другие функции. Приведем примеры трех ионных насосов: первый — Na^+ , K^+ -насос, обуславливающий «правильное» распределение ионов натрия и калия внутри и снаружи клетки (речь идет не только о нервных клетках); второй — группа транспортных механизмов, поддерживающих нужную концентрацию кальция на возбудимой мембране, а также внутри клеток; третий насос осуществляет транспорт протонов. В этом разделе рассматриваются две совершенно противоположные физиологические системы: Na^+ , K^+ -насос и механизм транспорта ионов кальция действуют против градиента концентрации посредством утилизации ионов АТФ и, напротив, протонный насос использует ток ионов для синтеза АТФ.

Реакция



обратима; две системы принципиально различаются тем, что клетка в одном случае (протонный насос) использует прямую реакцию, а в другом — обратную. В первом случае электрохимический потенциал ионного градиента используется при химическом синтезе (синтез АТФ), во втором — химическая энергия АТФ создает ионный градиент.

На первый взгляд энергозависимый синтез АТФ, по-видимому, нельзя рассматривать как нейрехимическую проблему, но между передачей сигнала и энергетическим сопряжением существует некоторое сходство. Оба этих процесса имеют много общего и осуществляются с помощью белков, встроенных в липидные мембраны. Их взаимосвязь четко прослеживается при обсуждении фотозависимого протонного насоса у галофильных бактерий (с. 181). Бактериальный рецептор, аналогичный рецепторам нейрона (гл. 8 и 9), воспринимает сигнал из окружающей среды и передает его внутрь через плазматическую мембрану. Следовательно, энергия света внешнего сигнала обеспечивает внутриклеточный синтез АТФ. Изучение бактериородопсина и механизма сопряжения фоторецепции, а также энергозависимого транспорта протонов (и наконец, синтеза АТФ) представляет особый интерес при исследовании нейрорецептора.

Натрий-калиевый насос

Дж. Скоу в 1957 г. открыл Na^+ , K^+ -АТФазу (КФ 3.6.1.3) — фермент, гидролизующий АТФ только в присутствии ионов натрия и калия (и Mg^{2+}) [2]. АТФаза является мембранно-связанным

ферментом и сейчас рассматривается как составная часть натрий-калиевого насоса [3]. Можно привести следующие доказательства:

1) гидролиз АТР и транспорт ионов Na^+ и K^+ в одинаковой степени зависят от наличия данных ионов; оба процесса требуют присутствия Na^+ , K^+ и Mg^{2+} ;

2) гликозиды дигиталиса, такие, как убаин (строфантин) и дигитоксин, ингибируют Na^+ , K^+ -АТРазу и насос в равной степени;

3) оба процесса могут осуществляться только в том случае, если АТР и Na^+ присутствуют внутри мембраны, а K^+ — снаружи. Гликозиды дигиталиса блокируют фермент и насос только снаружи;

4) опыты по реконструкции, в ходе которых очищенная Na^+ , K^+ -АТРаза встраивается в монослойные липосомы, показывают, что насос и фермент между собой по крайней мере тесно связаны;

5) из-за чрезвычайно высокой концентрации ионов натрия на внешней стороне мембраны реакция протекает в обратном направлении: АТРаза превращается в АТР-синтетазу, т. е. из АДФ и P_i синтезируется АТР.

В гл. 6 говорится о том, что активный и пассивный транспорт протекают абсолютно независимо. В табл. 7.1 приведены наиболее важные доказательства.

Исследования энергозависимости, ионной селективности, фармакологических свойств, а также плотности на единицу поверхности площади мембраны позволили сделать вывод о том, что обе транспортные системы действуют как отдельные молекулярные структуры.

Одной из наиболее интересных проблем биохимии является превращение химической энергии в механическую, что составляет основу таких биологических процессов, как мышечное сокращение, транспорт веществ между телом нейрона и синапсами, а также активный транспорт ионов и молекул через клеточную мембрану. Было подсчитано, что в состоянии покоя ~30% энергии дыхания используется на работу натрий-калиевого насоса.

Выделение и последующая характеристика молекул служат предпосылкой к пониманию молекулярного механизма данного процесса. Что же представляет собой Na^+ , K^+ -АТРаза? Выяснилось, что она состоит из двух субъединиц с M 95 000 и 45 000 (гликопротеин). Большая цепь, представляющая каталитическую субъединицу, была клонирована, определена ее первичная структура. Фермент Na^+ , K^+ -АТРаза имеет M 250 000. В ходе гидролиза АТР компоненты фермента кратковременно фосфорилируются и осциллируют между несколькими конфор-

Таблица 7.1. Сравнение пассивного и активного натриевого и калиевого ионного транспорта

Характеристика транспортной системы	Na^+ -канал и K^+ -канал	Na^+ , K^+ -насос
Направление движения ионов	По электрохимическому градиенту	Против электрохимического градиента
Источник энергии	Ионный градиент	АТР
Зависимость проводимости от потенциала	Зависит от потенциала	Не зависит
Ингибиторы	ТТХ блокирует g_{Na} при 10^{-8} моль/л; ТЭА блокирует g_{K} при 10^{-3} моль/л, убаин не оказывает никакого действия	Убаин блокирует при 10^{-7} моль/л ТТХ и ТЭА не оказывают действия
Внесклеточная концентрация Ca^{2+}	Увеличивает порог возбуждения	Действие не проявляется
Избирательность	Li^+ и Na^+ обладают одинаковой проницаемостью	Li^+ перекачивают гораздо медленней, чем Na^+
Влияние температуры	Скорость открывания и закрывания каналов характеризуется высоким температурным коэффициентом; нет влияния на максимальную проводимость	Охлаждение сильно тормозит скорость насоса
Поверхностная концентрация транспортной системы	Варьирует от 3 до 500 каналов/мкм ² (у кальмара); подсчитано по ТТХ-связывающим центрам	Между 750 (блуждающий нерв кролика) и 4000 насосов/мкм ² (кальмар); подсчитано по убаинсвязывающим центрам
Максимальная скорость транспорта Na^+	10^{-8} моль/(см ² ·с) во время восходящей фазы потенциала действия	$6 \cdot 10^{-11}$ моль/(см ² ·с) при комнатной температуре
Ингибиторы метаболизма	Не оказывают влияния; в аксоне, который перфузируется чистым солевым раствором, электрическая активность нормальная	CN^- (1 ммоль/л) и 2,4-динитрофенол (0,2 ммоль/л) блокируют, как только АТР исчерпывается

мациями. Полипептидная цепь с M 95 000 фосфорилируется с образованием ацилфосфата по карбоксильной группе глутаминовой кислоты в боковой цепи (рис. 7.4).

На рис. 7.5 изображена модель транспорта ионов, которую частично удалось подтвердить экспериментально. Транспорт ионов сопровождается следующими процессами:

1) транспортная система в конформации E_1 имеет более высокое сродство к Na^+ , чем к K^+ , на внутренней поверхности мембраны;

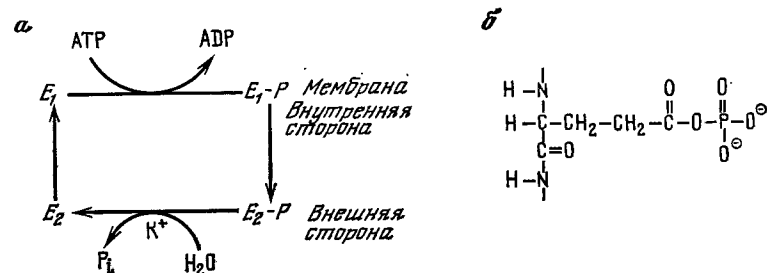


Рис. 7.4. Механизм действия, Na⁺, K⁺-АТРаза. а — фермент участвует в цикле фосфорилирования-дефосфорилирования, в результате АТФ гидролизуется до АДФ и P_i. Стадия фосфорилирования (киназная реакция) зависит от Na⁺ и Mg²⁺, дефосфорилирование (фосфатазная реакция) активируется K⁺; б — образование ангидрида остатка глутаминовой кислоты белка с фосфатной группой.

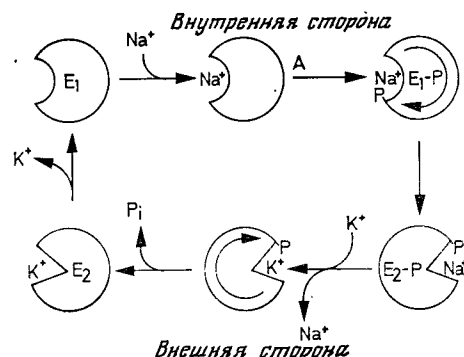


Рис. 7.5. Модель активного транспорта ионов через мембрану. Согласно модели, Na⁺, K⁺-насос является переносчиком с более высоким сродством к ионам натрия внутри клеточной мембраны, а к ионам калия — снаружи. Изменение сродства происходит вследствие конформационных изменений при фосфорилировании и дефосфорилировании. Неясно, каким образом натрийсвязывающие центры белков перемещаются с внутренней стороны мембраны на наружную. Не доказано вращение, предполагаемое моделью. Неясно также, почему на каждые три иона Na⁺ транспортируется только два иона K⁺. А=АТФ

2) фосфорилирование внутри клетки приводит к изменению конформации E₁→E₂ и вызывает перенос Na⁺;

3) в конформации E₂ транспортная система на внешней стороне мембраны обладает более высоким сродством к ионам калия;

4) K⁺ активирует расщепление фосфатной группы, в результате ионы K⁺ переносятся с наружной к внутренней стороне.

На рис. 7.5 показана кинетическая модель транспорта ионов, не отражающая молекулярных механизмов данного процесса. В частности, следует отметить, что вращение переносчика ионов в мембране, предлагаемое данной моделью, пока еще окончательно не подтверждено экспериментально. Напротив, как было показано, по крайней мере для системы транспорта Ca²⁺ саркоплазматического ретикулума, ионы кальция переносятся даже в том случае, если антитела блокируют движение его переносчика [14]. Вероятно, согласно модели, предложенной С. Сингером, не вращение, а конформационные изменения переносчика, обеспечивают транспорт ионов (рис. 7.6).

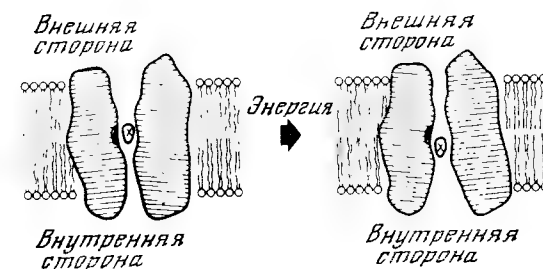


Рис. 7.6. Модель транспорта ионов, предложенная Сингером [17]. Модель не предусматривает вращения переносчика; некоторые биохимические данные свидетельствуют в пользу модели.

Роль различных полипептидных цепей в транспорте ионов пока еще не выяснена. Однако важным представляется то, что Na⁺, K⁺-АТРаза проявляет свою активность только в присутствии фосфолипидов [5], прежде всего фосфатидилсерина. Данная модель также не отражает еще одно важное свойство: соотношение сопряженно транспортируемых Na⁺ и K⁺ не равно 1:1. При гидролизе каждой молекулы АТФ приблизительно три иона Na⁺ транспортируются в обмен на два иона K⁺, что трудно себе представить при условии соревнования ионов за один связывающий центр в молекуле.

Насосы, транспортирующие заряды. Электрогенные насосы

Стехиометрия транспорта ионов имеет одно важное свойство: так как количество ионов натрия, транспортируемых из клетки, превышает количество входящих в клетку ионов калия, результирующий суммарный поток положительных ионов направлен наружу. Следовательно, натрий-калиевый насос представляет собой электрогенный насос [6]. В случае если ток че-

рез мембрану не уравновешен пассивными ионными токами, мембрана гиперполяризуется (рис. 7.7). Как уже было показано, мембранный потенциал обусловлен различной степенью проницаемости мембраны для ионов Na^+ и K^+ . Однако если Na^+ , K^+ -насос блокирован, то наблюдается деполяризация, что свидетельствует о вкладе электрогенного насоса в мембранный потенциал. В гигантском аксоне кальмара мембранный потенциал составляет только 1,8 мВ, что обусловлено его размером; в менее крупных нейронах или в клетках сердечной мышцы эта величина приближается к 20 мВ.

Сердечные гликозиды ингибируют натрий-калиевый насос

Задолго до того, как появились предположения о существовании активного транспорта ионов, было известно, что экстракт дигиталиса оказывает благотворное действие на сердечную

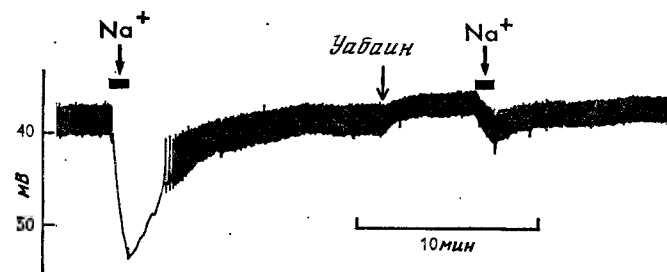


Рис. 7.7. Электрогенный характер Na^+ , K^+ -насоса. При введении Na^+ внутрь клетки (показано стрелкой) увеличивается мембранный потенциал, мембрана гиперполяризуется, поскольку выкачивается большее количество ионов натрия, чем накачивается ионов калия. Убаин, ингибитор насоса, блокирует гиперполяризацию, вызываемую введением ионов натрия [18].

мышцу. Гликозиды, подобно убаину (строфантину) или дигитоксину, были идентифицированы в этом экстракте в качестве действующего начала (рис. 7.8). Они обладают положительным инотропным действием, т. е. усиливают частоту и амплитуду сокращений сердечной мышцы, возможно, благодаря повышению концентрации кальция, необходимого для сокращения. При лечении сердечной недостаточности важное значение отводится использованию гликозидов.

Связь между положительным инотропным эффектом и Na^+ , K^+ -насосом остается пока неизвестной; однако ясно, что ингибирование АТФазы обуславливают побочный токсичный эффект препарата дигиталиса, а также снабжение ионами кальция тропонина, принимающего участие в механизме сокращения.

В большинстве тканей при концентрации убаина 0,1—1 мкмоль/л наблюдается 50%-ное ингибирование Na^+ , K^+ -АТФазы. При этом в основном ингибируется K^+ -зависимое дефосфорилирование (рис. 7.8), однако при более высокой концентрации стероидов может блокироваться и Na^+ , Mg^{2+} -зависимое фосфорилирование фермента. Ингибирование происходит на внешней стороне мембраны.

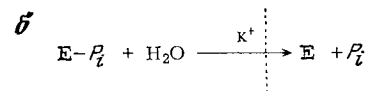
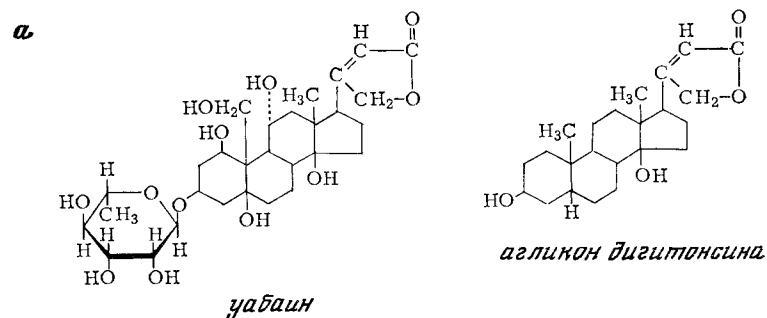


Рис. 7.8. Сердечные гликозиды блокаторы Na^+ , K^+ -АТФазы. а — убаин и агликон дигитоксина; дигитоксин образуется из агликона при гликозилировании. Агликон дигитоксина относится к группе стероидов; б — убаин ингибирует K^+ -зависимую стадию дефосфорилирования АТФазы и блокирует ионный насос только на наружной стороне мембраны.

Механизм транспорта Ca^{2+}

Кальций выполняет в клетке различные функции; разнообразны и механизмы регулирования его концентрации:

1) в мышечных волокнах большинства ракообразных ионы Ca^{2+} выполняют роль ионов Na^+ , обуславливая входящий ток при потенциале действия;

2) ионы кальция влияют на пороговое значение потенциала действия, который возрастает по мере увеличения концентрации Ca^{2+} на внешней стороне мембраны;

3) Ca^{2+} является сигналом инициации мышечного сокращения. Кроме того, он стимулирует высвобождение энергии, необходимой для мышечного сокращения, путем активации фосфорилаторы b-киназы, т. е. инициирует процессы гликогенолиза и гликолиза;

4) вход Ca^{2+} с последующей деполяризацией мембраны необходим для высвобождения медиатора из пресинаптического окончания.

Вот некоторые процессы, осуществляющие регуляцию внутриклеточной концентрации кальция (рис. 7.9):

1) митохондрия способна аккумулировать кальций в больших концентрациях и, следовательно, поглощать его из цитоплазмы [7]. Активный транспорт Ca^{2+} сопряжен с фосфатным транспортом, направленным внутрь. Источником энергии является электронная транспортная цепь;

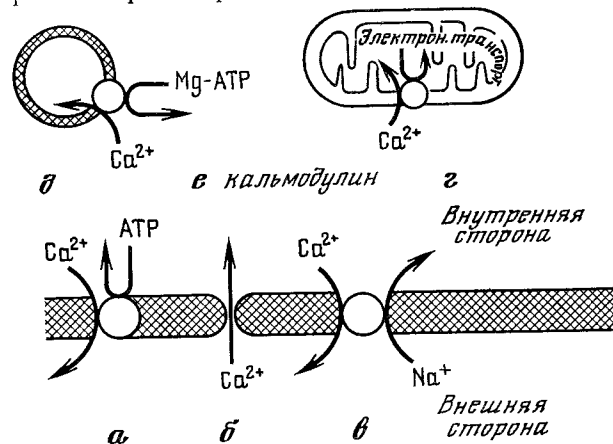


Рис. 7.9. Функции Ca^{2+} внутри клетки. Пассивно входящий поток ионов кальция (б) вводится из цитоплазмы посредством активного транспорта через клеточную мембрану (а), через митохондрию (г), через саркоплазматический ретикулум (д), выходящим током (в), сопряженным с входящим натриевым током, фиксируется кальмодулином и другими Ca^{2+} -связывающими белками (е).

2) в мышечных клетках посредством активного транспорта саркоплазматический ретикулум удаляет Ca^{2+} , высвобожденный при нервном импульсе. Этот процесс обеспечивается Ca^{2+} , Mg^{2+} -активируемой АТразой;

3) существует постоянный пассивный приток ионов Ca^{2+} через мембрану нерва. В восходящей фазе потенциала действия пассивная кальциевая проницаемость увеличивается, таким образом должен существовать механизм удаления входящих ионов кальция. В гигантском аксоне кальмара пассивный входящий натриевый поток обеспечивает транспорт Ca^{2+} наружу [8]. Предполагается, что общий переносчик функционирует по принципу вращающейся двери — впускает и выпускает по одному иону.

4) существуют специфические Ca^{2+} -связывающие белки — кальмодулин и кальцинейрин (гл. 10).

Вкратце рассмотрим Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРазу мембраны саркоплазматического ретикулума, биохимические особенности которой подробно охарактеризованы. Молекула фермента состоит из одной полипептидной цепи (M 100 000), возможно, это протеолипид. Частичное расщепление трипсином показало, что обе функции — гидролиз АТР и транспорт ионов — осуществляются на разных участках одной и той же полипептидной цепи. Фрагмент триптического расщепления с M 30 000 содержит участок, который, как и в Na^+ , K^+ -насосе, временно фосфорилируется АТР; другой фрагмент с M 20 000 может быть встроен в искусственную липидную мембрану с появлением селективной кальциевой проводимости. Возможно, что он представляет собой ионофор [9]. При этом, однако, не выяснен механизм сопряжения энергии гидролиза АТР с ионным транспортом.

При гидролизе одной молекулы АТР перемещаются два иона кальция; фосфатная группа АТР переносится на остаток аспарагиновой кислоты в молекуле АТРаза. Если полностью удалить липиды, АТРаза теряет свою активность; вероятно, липиды составляют важную часть системы, как и в случае Na^+ , K^+ -насоса.

Более полная информация о механизме транспорта Ca^{2+} получена в ходе экспериментов по реконструкции: высокоочищенная АТРаза успешно встроена в искусственные липидные везикулы, которые затем активно захватывают ионы кальция. В данном случае здесь, как и во всех экспериментах по реконструкции, главная цель состоит в воспроизведении биологических условий путем использования биохимически охарактеризованных компонентов и, следовательно, постепенного воссоздания молекулярного процесса. Исключая и добавляя отдельные части биологической системы, стало возможным идентифицировать компоненты биологической мембраны, обуславливающие данную функцию. Ракер и др. [10] показали, что протеолипид, ассоциированный с белковой молекулой ($M \sim 100$ 000), является необходимым участником ионного транспорта, но не гидролиза АТР.

Протонный насос: синтез АТР функционально противоположен активному транспорту

Протонный насос представляет собой значительно более сложную систему по сравнению с ионными насосами, описанными ранее. Его физиологическая функция заключается не в ионном транспорте, а, наоборот, в использовании ионного градиента для синтеза АТР — наиболее важного энергетического источника клетки. Митохондриальная электронная транспортная цепь, сопряженная с дыхательной цепью, генерирует необходимый градиент протонов. Некоторые микроорганизмы в качестве источника энергии вместо дыхания используют свет (см. ниже).

На электронных микрофотографиях на внутренней стороне митохондриальной мембраны видны характерные частицы, соединенные с ней маленькими жгутиками. После длительных дебатов о возможности появления артефактов при окрашивании препаратов в электронной микроскопии сейчас считают, что эти частицы не что иное, как молекулы АТФазы. Исследователей главным образом занимает вопрос: какие молекулы и какие молекулярные механизмы участвуют в ионном транспорте, синтезе и гидролизе АТФ, и как все это связано с «жгутиковыми» частицами?

Модели протонных насосов

Предложены три гипотетические модели, причем первая наиболее предпочтительна [11].

1. Согласно *хемиосмотической гипотезе*, называемой также гипотезой Митчелла (рис. 7.10), молекулы дыхательной цепи располагаются в мембране векторно и различные стадии электронного переноса (от субстрата до кислорода) сопровождаются транспортом протонов наружу, что вызывает падение рН на внешней стороне мембраны по сравнению с внутренней.

Создается электрохимический градиент: внутри мембраны потенциал более отрицательный, чем снаружи. Митчелл полагал, что градиент рН способствует в активном центре АТФазы получению АТФ путем отщепления молекулы воды от АДФ и P_i . Таким образом, в матриксе в результате электронного переноса освобождается протон, а на наружной стороне мембраны появляется гидроксил [12].

Важнейшим следствием наличия протонного градиента и электрохимического потенциала является образование АТФ.

2. *Химическая гипотеза* связывает появление богатого энергией интермедиата для синтеза АТФ с потоком протонов. Исходным соединением в данном случае будет 1,3-дифосфоглицерат, который получается в процессе гликолиза при окислении 3-фосфоглицеральдегиддегидрогеназой и далее реагирует с АДФ с образованием АТФ и соответствующей кислоты.

3. Согласно *конформационной гипотезе*, энергия для синтеза АТФ получается при переходе АТФазы из энергетически богатой конформации в энергетически бедную. Электрохимическая энергия протонного градиента используется для перевода АТФазы в богатую энергией конформацию при высвобождении образованного АТФ.

Все три гипотезы не являются взаимоисключающими. Так, вторая и третья сформулированы в то время, когда существовали различные точки зрения о главном источнике энергии при синтезе АТФ; одни считали, что это протонный транспорт, а другие — электронный. И на этот вопрос все еще нет достаточно

определенного ответа; однако получены прямые доказательства в пользу непосредственного участия в процессе протонного транспорта: не электронный транспорт, а разбавители, подобно 2,4-динитрофенолу, ингибируют синтез АТФ. Благодаря их действию мембрана становится проницаемой для протонов, т. е. блокируется возникновение градиента рН; этот факт свидетельствует в пользу модели Митчелла. Другое блестящее доказательство было получено в ходе изучения галофильных пурпурных бактерий (*Halobacterium halobium*), которые синтезируют АТФ, используя энергию света [13]. В данном случае, хотя специфические ингибиторы могут блокировать цепь переноса электронов, тем не менее АТФ образуется до тех пор, пока родопсин поглощает свет и поэтому генерирует в клеточной мембране протонный градиент. Вопрос о взаимоотношении синтеза АТФ у этих экзотических бактерий, обнаруженных в Соленом озере (США), и соответствующим процессом в нейронах высших организмов был экспериментально разрешен при встраивании бактериородопсина в искусственные липидные везикулы; этот эксперимент выполнен двумя группами исследователей: Ракером, который занимался выделением и реконструкцией митохондриальной АТФазы, и Стоккениусом, изучавшим пурпурную мембрану галобактерий. Освещение вызывало транспорт протонов через липидную мембрану. Затем Ракер к этим везикулам добавлял очищенную АТФазу из митохондрии быка. При освещении происходил синтез АТФ из АДФ и P_i .

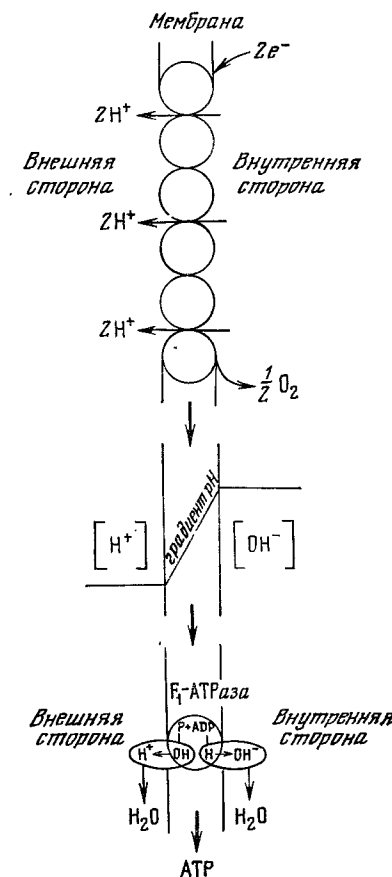


Рис. 7.10. Синтез АТФ как обратимый протонный насос. Согласно Митчеллу, во время окислительного электронного транспорта протоны проникают через мембрану. Созданный градиент рН и мембранный потенциал способствуют синтезу АТФ. И наоборот, градиент рН образуется при гидролизе АТФ [12]. (Воспроизводится с разрешения А. Ленинджера.)

Синтез АТФ как обратимый протонный насос. Согласно Митчеллу, во время окислительного электронного транспорта протоны проникают через мембрану. Созданный градиент рН и мембранный потенциал способствуют синтезу АТФ. И наоборот, градиент рН образуется при гидролизе АТФ [12]. (Воспроизводится с разрешения А. Ленинджера.)

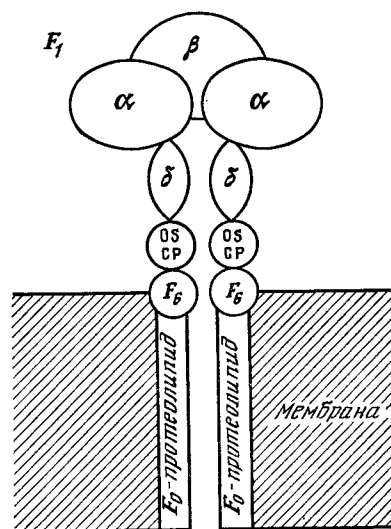


Рис. 7.11. Модель митохондриальной АТФ-синтазы (продольный участок). Протонный ток через мембранный ионофор, так называемая F_0 -фракция, способствует синтезу АТФ из АДФ и P_i (см. рис. 7.10) в головке (F_1) белкового комплекса; F_1 — белок, который в выделенном состоянии обладает АТФазной активностью. Механизм синтеза еще не выяснен, а функция субъединиц весьма гипотетична [14]. F_1 имеет четвертичную структуру $\alpha_3\beta_3$.

рия на полиакриламидном геле выявляются другие неидентифицированные полосы. Таким образом, ясно, что сопряжение «движущей силы протона» Митчелла и синтеза АТФ обуславливает существование сложной биохимической структуры. По-видимому, потребуется провести еще значительное исследование, прежде чем мы поймем молекулярные механизмы данного процесса.

На что похож ионный насос?

Наиболее четкое представление об ионном насосе было получено в ходе изучения пурпурной мембраны галофильных бактерий. Данный светозависимый протонный насос представляет собой часть мембранного комплекса, включающего рецепторы (в данном случае фоторецепторы), посредством которых внеклеточный сигнал (свет, источник энергии) превращается в внутриклеточ-

В заключение дадим краткое описание молекулярной структуры одного типа протонного насоса (рис. 7.11). Митохондриальная система построена из многочисленных полипептидных цепей [14]. Главный компонент — так называемая F_1 -АТФаза с M 360 000, состоящая из шести цепей различного размера (3 α -цепи, M 50 000; 3 β -цепи, M 53 000). F_1 -АТФаза связана с мембраной посредством трех субъединиц: δ -цепь, олигомицинчувствительный белок (M 8 000) и F_6 .

Протеолипид, связанный с другим фактором — F_0 , образует своеобразную пору, через которую протоны проникают через мембрану. Он взаимодействует с ингибиторами энергетического переноса, такими, как N,N' -дициклогексилкарбодимид (DCCD). Однако существует еще один менее устойчивый сопрягающий фактор F_2 . Даже в самых очищенных препаратах АТФазы при электрофоретическом анализе в присутствии додецилсульфата натрия

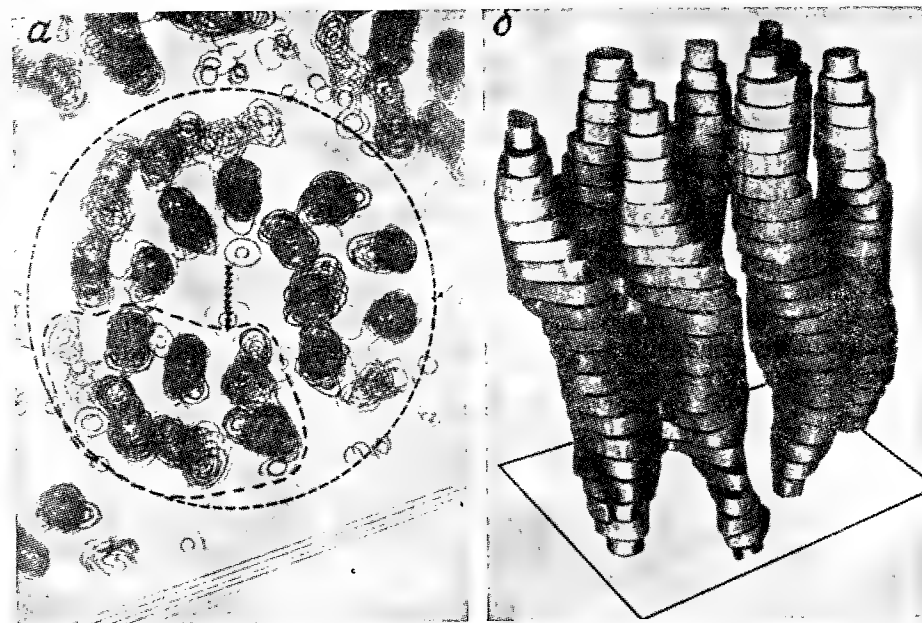


Рис. 7.12. Электронная микрофотография высокого разрешения бактериородопсина — светозависимого протонного насоса галофильных бактерий. Во многих отношениях эта структура подходит для использования в качестве модели ионного транспорта через другие (нейрональные) мембраны. Каждая молекула состоит из семи спиральных полипептидных цепей, пронизывающих мембрану (б). На карте электронной плотности (а) видно, что три молекулы ассоциированы в единое структурное образование, в котором внутреннее кольцо включает девять и внешнее — двенадцать полипептидных спиралей. В центре расположены липиды. Каждая молекула бактериородопсина является активным протонным насосом. (Воспроизводится с разрешения R. Henderson и McMillan Journals Ltd.) [15].

ный эффект — синтез АТФ. Следовательно, данный насос характеризуют общие принципы, которые обсуждаются далее. Эти принципы справедливы и для других модельных систем, имеющих большое значение в нейрохимии, например для гораздо более сложного и до конца не изученного митохондриального протонного насоса, сопряженного с дыхательной цепью митохондрий и Na^+ , K^+ -насосом плазматических мембран.

Пурпурная мембрана содержит 75% бактериородопсина — белка с $M \sim 26$ 000, образующего основание Шиффа с одной молекулой ретиналя. Молекулы родопсина уложены в такую правильную упаковку, что пурпурная мембрана может рассматриваться как «двумерный кристалл». α -Спиральные участки составляют 70—80% полипептидной цепи. Хендерсон и Анвин [15]

определили методом электронной микроскопии с разрешением 0,7 нм укладку полипептидных цепей в мембране (рис. 7.12). Группы из семи α -спиральных столбов пронизывают мембрану и образуют молекулу размером 2,5·3,5·4,5 нм, причем наиболее протяженный участок располагается перпендикулярно поверхности мембраны. Три молекулы локализируются вокруг оси симметрии третьего порядка таким образом, что образуют внутреннее и внешнее кольца (последнее из 12 α -спиралей). Внутреннее кольцо диаметром 2,0 нм состоит из липида (четко проявляющегося на карте электронной плотности, рис. 7.12, а). Ретиналь, по-видимому, связан с боковой цепью лизина и располагается между тремя внутренними и четырьмя внешними спиралями белковой молекулы. Каждая молекула бактериородопсина представляет собой активный протонный насос. Функциональная роль тримера, обнаруженного методом электронной микроскопии, неизвестна. Модель Хендерсона и Анвина подтверждает основную концепцию: система ионного транспорта состоит из интегральных (пронизывающих толщу мембраны) спирально уложенных полипептидных цепей. Поскольку аминокислотная последовательность бактериородопсина известна, в основном информация касается структуры этого ионного насоса. Как и в случае родопсина сетчатки, многое известно о фотохимии световой активации. Возможно, этот биохимически охарактеризованный протонный насос галофильных бактерий окажется первой системой с полностью выясненным функциональным механизмом. В свою очередь это поможет исследовать аналогичные транспортные системы в клетках высших организмов.

Выводы

Активный ионный транспорт в нервной клетке имеет множество функций: поддерживает мембранный потенциал возбудимой мембраны (натрий-калиевый насос), регулирует внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} (Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРаза) и обеспечивает клетку энергией (F_1 -АТРаза, протонный насос). Натрий-калиевый насос является электрогенным — на каждые три иона Na^+ , транспортируемых наружу, направляются внутрь два иона K^+ ; таким образом, при каждом цикле из клетки забирается по одному положительному заряду. АТФ предоставляет энергию для обеспечения активного транспорта (против ионного градиента), т. е. осуществляет связь между передачей импульса и метаболизмом нервной клетки. Система ионного транспорта включает АТРаза и ионофор — сложные мембранные белки. Один из белковых компонентов подвергается промежуточному фосфорилированию с помощью АТФ. Гликозид дигиталиса и убаин (стро-

фантин) ингибируют натрий-калиевый насос путем блокирования стадии дефосфорилирования.

Ионы кальция осуществляют контроль за процессами генерации потенциалов действия и секреции нейромедиатора из нервного окончания, а также являются связывающим звеном между нервным импульсом и мышечным сокращением. Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРаза в мембранах митохондрии и саркоплазматического ретикула регулируют концентрацию кальция в цитоплазме. Система транспорта была выделена, биохимически охарактеризована и функционально идентифицирована при встраивании в искусственную липидную мембрану (реконструкция).

Протонный насос в отличие от других АТРаз синтезирует АТФ благодаря наличию градиента протонов. Данная система выделена из митохондриальной мембраны, частично охарактеризована биохимическими методами и путем анализа реконструированных систем. Методом электронной микроскопии высокого разрешения определена трехмерная структура светозависимого протонного насоса галофильных бактерий. Все эти данные подтверждают ряд выдвинутых ранее гипотез о том, что такие транспортные системы состоят из α -спиральных полипептидных цепей, пронизывающих мембрану.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. *Hodgkin A. L., Keynes R. D.*, Active transport of cations in giant axons from Sepia and Loligo, *J. Physiol. (London)*, **128**, 28—60 (1955).
2. *Skou J. C.*, The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerve, *Biochim. Biophys. Acta*, **23**, 394—401 (1957).
3. *Dahl J. L., Hokin L. E.*, The sodium potassium adenosine triphosphatase, *Ann. Rev. Biochem.*, **43**, 327—356 (1974).
4. *Dutton A., Rees E. D., Singer S. J.*, An experiment eliminating the rotating carrier mechanism for the active transport of Ca^{2+} ions in sarcoplasmic reticulum membranes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 1532—1536 (1976).
5. *Priestland R. N., Whittam R.*, The temperature dependence of activation by phosphatidylserine of the sodium pump adenosine triphosphatase, *J. Physiol.*, **220**, 353—361 (1972).
6. *Thomas R. C.*, Electrogenic sodium pump in nerve and muscle cells, *Physiol. Rev.*, **52**, 563—594 (1972).
7. *Bygrave F. L.*, Mitochondrial calcium transport, *Curr. Top. Bioenerg.*, **6**, 259—318 (1977).
8. *Baker P. F., Hodgkin A. L., Ridgway E. B.*, Depolarization and calcium entry in squid giant axons, *J. Physiol.*, **218**, 709—755 (1971).
9. *Shamoo A. E., Ryan T. E., Stewart P. S., MacLennan D. H.*, Localization of ionophore activity in a 20 000 dalton fragment of the adenosine triphosphatase of sarcoplasmic reticulum, *J. Biol. Chem.*, **1**, 4147—4157 (1976).
10. *Racker E., Eytan E.*, A coupling factor from sarcoplasmic reticulum required for the translocation of Ca^{2+} ions in a reconstituted Ca^{2+} ATPase pump, *J. Biol. Chem.*, **250**, 7533—7534 (1975).
11. *Boyer P. D., Chance B., Ernster L., Mitchell P., Racker E., Slater E. C.*, Oxidative phosphorylation and photophosphorylation, *Ann. Rev. Biochem.*, **46**, 944—1026 (1977).

12. *Lehninger A. L.*, Biochemistry, 2nd edition, Worth Publishers, Inc., New York, 1975.
13. *Stoeckenius W., Bogomolni R. A.*, Bacteriorhodopsin and related pigments of halobacteria, *Ann. Rev. Biochem.*, **52**, 587—616 (1982).
14. *Racker E.*, Structure and function of ATP-driven ion pumps, *TIBS*, **1**, 244—247 (1976).
15. *Henderson R., Unwin P. N. T.*, Three-dimensional model of purple membrane obtained by electron microscopy, *Nature*, **257**, 28—32 (1975).
16. *Eccles J.*, The Understanding of the Brain, McGraw Hill, 1973.
17. *Singer S. J.*, The molecular organization of membranes, *Ann. Rev. Biochem.*, **43**, 805—833 (1974).
18. *Thomas R. C.*, Membrane current and intracellular sodium changes in snail neuron during extrusion of injected sodium, *J. Physiol.*, **201**, 495—514 (1969).

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА

- Tanford Ch.*, Mechanism of free energy coupling in active transport, *Ann. Rev. Biochem.*, **52**, 379—409 (1983).
- Amsel L. M., Pedersen P. L.*, Proton ATPases: Structure and mechanism, *Ann. Rev. Biochem.*, **52**, 801—824 (1983).
- Stoeckenius W., Bogomolni R. A.*, Bacteriorhodopsin and related pigments of halobacteria, *Ann. Rev. Biochem.*, **51**, 587—616 (1982).
- Campbell A. K.*, Intracellular Calcium, John Wiley & Sons, New York, 1983.
- Joergensen P. L.*, Mechanism of the Na⁺, K⁺ pump, *Biochim. Biophys. Acta*, **694**, 27—68 (1982).
- Klee C. B., Vanaman T. C.*, Calmodulin, *Adv. Protein Chem.*, **35**, 213—303 (1982).
- Goldin S. M., Moczydlowski E. G., Papazian D. M.*, Isolation and reconstitution of neuronal ion transport proteins, *Ann. Rev. Neurosci.*, **6**, 419—446 (1983).

СИНАПС. ЧАСТЬ 1

Нейрон и синапс. Исторический очерк

Вальдайер в 1891 г. сформулировал нейронную теорию, согласно которой нервная система состоит из множества отдельных клеток — нейронов, а не из непрерывной цитоплазмы, как постулировалось в отвергнутой им ретикулярной теории, которая описывала нервную систему как синцитий — объединение клеток, не разделенных мембранами. Нейронная теория была подтверждена в основном работами Рамон-и-Кахала и, в конце концов, стала общепринятой. В ней оставался, однако, неясным важнейший вопрос: каков механизм коммуникации между единичными нейронами. Шеррингтон в 1897 г. ввел термин «синапс» для обозначения гипотетического образования, или области, специализирующегося на обмене сигналами между клетками. Четверть века спустя концепция синапса стала общепринятой в нейробиологии и до сих пор синапс остается одним из наиболее интересных объектов биологических исследований.

Чем же интересен синапс?

В гл. 5 мы коротко остановились на электрофизиологической модели синапса и ввели два альтернативных механизма функционирования, соответствующих двум типам синапсов — возбуждающим и тормозным. В возбуждающих синапсах осуществляется перенос нервного импульса от одной клетки к другой, а в тормозных — полученный клеткой импульс препятствует ее возбуждению. Главная функция синапса состоит, следовательно, в осуществлении модуляции нервного импульса. Серия потенциалов действия, проходящих по аксону к нервному окончанию, на синапсе может быть усилена, ослаблена или передана следующей клетке без изменения.

Полагают, что синапс, будучи местом внутренней регуляции нервного импульса, служит также местом временных или постоянных изменений при хранении информации (обучение и память) или при поведенческих реакциях в ответ на внешние стимулы (адаптация и привыкание). Это так называемая *пластичность* синапса.

Синапс — также место внешней регуляции, т. е. место, на которое воздействуют лекарства и токсины. Классический пример — это яд *кураре*, который использовался туземцами Южной Америки; как показал в прошлом веке Клод Бернар, этот яд блокирует прохождение нервного импульса к мышечным волокнам. На синаптическую передачу влияют также многочисленные анестетики и психофармакологические препараты.

Синапсы отвечают за целый ряд *патологических расстройств*. В качестве примеров мы обсудим позднее паркинсонизм, миастению и психические нарушения типа шизофрении (гл. 9).

В системе клеточной коммуникации синапс часто несет важную функцию «выпрямителя», или клапана: он полярен и поэтому проводит импульс только в одном направлении.

Наконец, синапс — это ключ к специфичности нейрональных связей. При функционировании нервной системы схема соединений нейрональной сети определяется не случайным образом, а генетическими и, возможно, некоторыми другими внутренними и внешними факторами, которые и обуславливают то, какие именно клетки соединятся вместе при онтогенезе синаптического контакта. Образование синапсов весьма специфично (например, аксоны находят свои мишени и иннервируют их) и генетически запрограммировано в клетках.

Специфичность, полярность, модуляция, пластичность, фармакология и патологические изменения — вот ключевые явления, молекулярные механизмы которых суть основные предметы нейробиологии, обсуждаемые подробно в последующих главах.

Электрические и химические синапсы

Передача сигналов от клетки к клетке может осуществляться либо путем прямого прохождения потенциалов действия (электрические синапсы), либо с помощью специальных молекул — нейромедиаторов (химические синапсы). В зависимости от своих специфических функций синапсы имеют очень разные структуры. В химических синапсах расстояние между клетками составляет ~20—40 нм; синаптическая щель между клетками — это часть межклеточного пространства; она содержит жидкость с низким электрическим сопротивлением, так что электрический сигнал рассеивается прежде, чем он достигнет следующей клетки. Электрическая передача, напротив, осуществляется только в специализированных структурах — щелевых контактах, где клетки находятся на расстоянии ~2 нм и соединяются проводящими каналами. В действительности здесь имеется нечто сходное с постулированным ранее синцитием, или многоклеточным цитоплазматическим континуумом. По иронии истории нау-

ки открытие электрического синапса Фершпаном и Поттером произошло в 1959 г., когда нейронная теория окончательно вытеснила ретикулярную.

Свойства электрического синапса

Электрические синапсы сравнительно редки, и их роль в центральной нервной системе высших организмов пока неясна. Фершпан и Поттер открыли их в брюшном нерве краба, а позднее их обнаружили в многочисленных организмах: моллюсках, членистоногих и млекопитающих. В противоположность химическому синапсу, где прохождение импульса несколько задерживается из-за высвобождения и диффузии медиатора, сигнал через электрический синапс передается быстро. Физиологическая важность таких синапсов может, следовательно, быть связана с необходимостью быстрого сопряжения специфических клеток.

Биохимических исследований структуры и механизма действия электрических синапсов до сих пор не проводилось. Однако щелевыми контактами связаны не только нервные клетки, но также и клетки печени, эпителия, мышц и многих других тканей. Из них удалось выделить и охарактеризовать биохимическими методами и электронной микроскопией мембранные фрагменты, которые определенно сохраняли зоны межклеточных контактов. Электронные микрофотографии показывают упорядоченные структуры частиц, которые Гудинаф назвал *коннексами* [1] и которые образуют каналы между клетками, отстоящими друг от друга на 2 нм. Из этих мембран были выделены два полипептида с M 25 000 и 35 000, названные *коннексинами*. Возможно, что два коннексона соседних клеток посредством димеризации могут образовать канал (рис. 8.1). Показано, что этот канал пропускает не только ионы щелочных металлов, но и молекулы с M 1000—2000. Таким образом, коннексоны, кроме электрического сопряжения, обеспечивают для клеток возможность обмена метаболитами. Проницаемость таких каналов могут регулировать ионы кальция.

Химический синапс — место регуляции нервной системы

На рис. 8.2 представлена схема химического синапса. Он состоит из нервного окончания на пресинаптической стороне и специализированной области на поверхности принимающей сигнал клетки на постсинаптической стороне. Пре- и постсинаптические мембраны находятся на расстоянии 20—40 нм. Синаптическая щель, видимо, заполнена олигосахаридсодержащей соединительной тканью — *базальной мембраной*, представляющей собой поддерживающую структуру для обеих объединенных клеток.

Субсинаптическая мембрана — область постсинаптической мембраны, прямо противоположная пресинаптическому нервному окончанию, — с помощью электронной микроскопии [2] rozpoзнается как утолщение (рис. 8.3). В нейромышечных синапсах (концевых пластинках позвоночных) она сильно втячена. Пресинаптическое нервное окончание содержит митохондрии и, кроме того, особые пузырьки — синаптические везикулы, в которых хранится нейромедиатор.

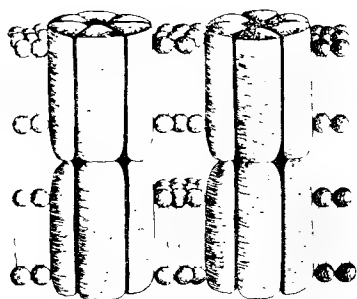


Рис. 8.1. «Щелевой контакт». Модель области контакта между клетками. Подобная структура была предложена для электрических синапсов. Субъединицы белка образуют каналы, которые пронизывают липидный бислой. (С разрешения Goodenough и Cold Spring Harbor Laboratory.) [1].

В то время как электрофизиологи работают с интактным синапсом, биохимики пытаются выделить его функциональные субструктуры посредством контролируемого разрушения и последующего фракционирования методом центрифугирования в градиенте плотности. Примерами таких субструктур являются *синаптосомы* — оторванные от аксонов и замкнутые нервные окончания (рис. 8.3, а), синаптические везикулы, пресинаптические мембраны, *синаптические комплексы* (рис. 8.3, б), в которых постсинаптические мембраны, или утолщения, остаются связанными с отдельными участками пресинаптической мембраны, и выделенные постсинаптические утолщения. Особенно полезной для исследований субклеточной фракцией нервной системы оказалась фракция синаптосом. Впервые их очистку и применение осуществил В. П. Уиттейкер, и сегодня это вполне обычный объект изучения во многих нейробиологических лабораториях. Препараты синаптосом сохраняют почти все свойства интактного нервного окончания, а именно мембранную возбудимость, поглощение метаболитов, медиаторов или их предшественников, а также Ca^{2+} -зависимое высвобождение медиатора при деполяризации. К тому же синаптосомы — ценный исходный материал для последующего субфракционирования. При осмотическом шоке они высвобождают свою цитоплазму и внутриклеточные органеллы (в том числе функционально важные синаптические везикулы), а при подходящих условиях из них можно получить препараты, обогащенные пресинаптическими и/или постсинаптическими мембранами, включая синаптические комплексы и постсинаптические утолщения. Синаптосомы, приготовленные из

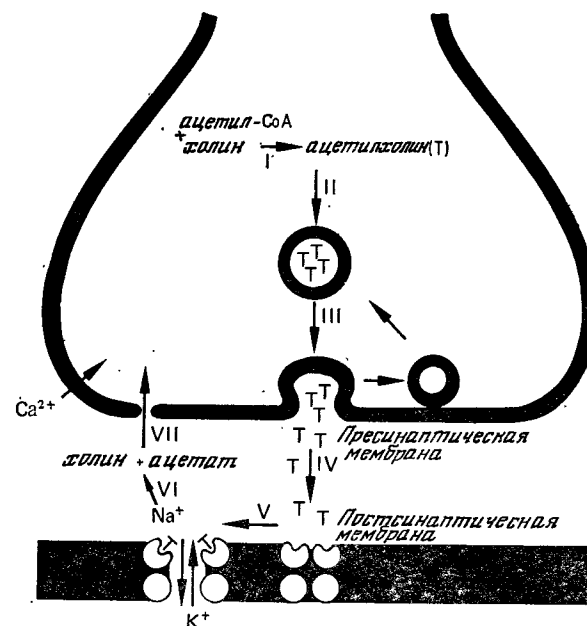


Рис. 8.2. Схема никотинного холинэргического синапса. Пресинаптическое нервное окончание содержит компоненты для синтеза нейромедиатора (здесь ацетилхолина). После синтеза (I) нейромедиатор упаковывается в пузырьки (везикулы) (II). Эти синаптические везикулы сливаются (возможно, временно) с пресинаптической мембраной (III), и нейромедиатор высвобождается таким путем в синаптическую щель. Он диффундирует к постсинаптической мембране и связывается там со специфическим рецептором (IV). В результате образования нейромедиатор-рецепторного комплекса постсинаптическая мембрана становится проницаемой для катионов (V), т. е. деполяризуется. (Если деполяризация достаточно высока, то появляется потенциал действия, т. е. химический сигнал снова превращается в электрический нервный импульс.) Наконец, медиатор «инактивируется», т. е. либо расщепляется ферментом (VI), либо удаляется из синаптической щели посредством особого «механизма поглощения». В приведенной схеме только один продукт расщепления медиатора — холин — поглощается нервным окончанием (VII) и используется вновь. Базальная мембрана — диффузная структура, идентифицируемая методом электронной микроскопии в синаптической щели (рис. 8.3, а), здесь не показана.

ткани мозга, неоднородны по типу нейромедиатора, поскольку получают из всего разнообразия нейронов, присутствующих в этой ткани. Однако и они представляют ценность для многих исследований функций нейронов, в особенности синаптической функции; это хорошая экспериментальная система, широко применяемая в нейробиологии, нейрофармакологии и нейротоксикологии.

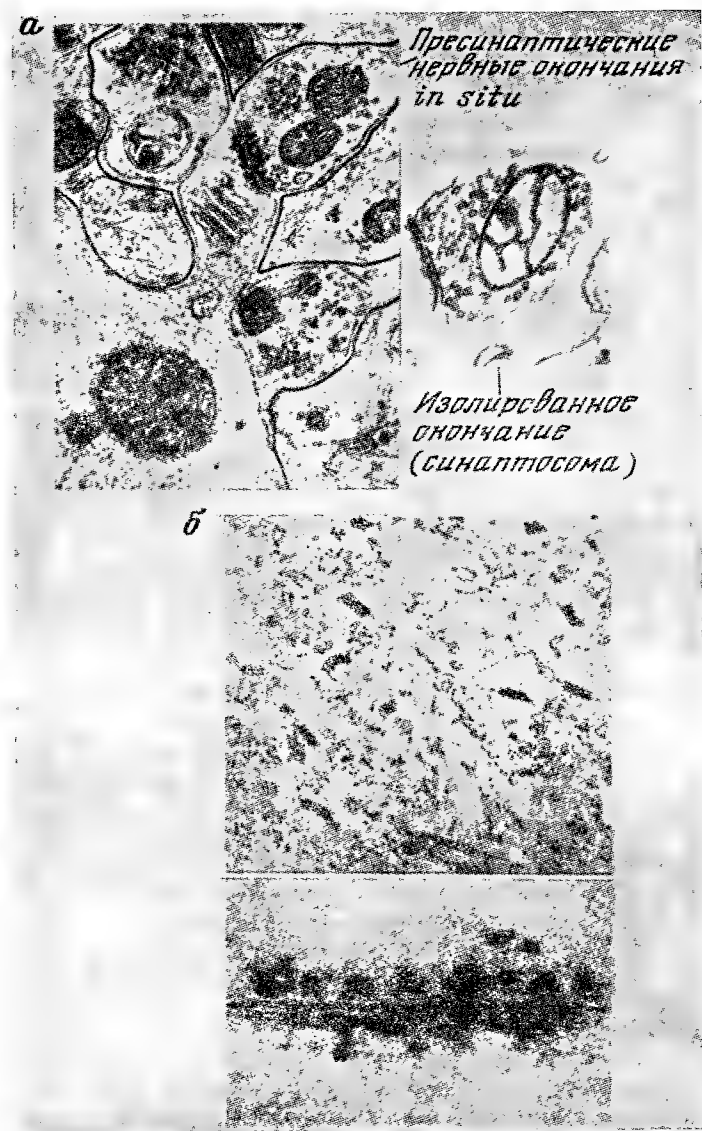


Рис. 8.3. а — электронная микрофотография синапса. Слева — нервные окончания *in situ* (обведены); справа — изолированные и замкнутые окончания (синаптосомы). Большие темные органеллы — это митохондрии, маленькие светлые — синаптические пузырьки [27]; б — синаптические комплексы, которые могут быть выделены из гомогенатов нервной ткани, состоят из спаренной пре- и постсинаптической мембраны. Стрелкой указана базальная мембрана, которая может связывать пре- и постсинаптическую мембрану. Увеличение $\times 33\,000$ (верхняя фотография), $\times 218\,000$ (нижняя) [2].

Холинэргические синапсы периферической и центральной нервной системы

Единого холинэргического синапса не существует. Холинэргические синапсы представляют собой группу структурно, функционально и фармакологически весьма различных синапсов. Объединяет их только одно — использование ацетилхолина в качестве нейромедиатора. Особого внимания заслуживают нейромышечные соединения, где нервный импульс передается мышечному волокну и вызывает его сокращение. Имеются, однако, многочисленные свидетельства того, что холинэргические синапсы, кроме этой периферической функции, играют важную роль в центральной нервной системе [3, 4], участвуя в таких процессах, как поведение, сознание, эмоции, обучение и память. Доказательствами этого служат биохимические исследования метаболизма ацетилхолина и ассоциированных ферментов в центральной нервной системе, а также эксперименты с психофармакологическими веществами, влияющими на холинэргические синапсы. Ацетилхолин представляет собой также важный медиатор вегетативной нервной системы. Во всех ганглиях симпатических и парасимпатических систем имеются холинэргические синапсы. В постганглионарных, т. е. соединяющих ганглий и орган-мишень, нервных волокнах ацетилхолин опосредует передачу нервного импульса во всех парасимпатических синапсах (т. е. синапсах глаз, сердца, легких, желудка, кишечника) и в некоторых симпатических (например, синапсах потовых желез).

Два класса холинэргических синапсов — мускариновый и никотиновый

Пре- и постганглионарные холинэргические синапсы не идентичны; они различаются как по своим электрофизиологическим, так и фармакологическим свойствам. Высвобождение ацетилхолина из нервного окончания преганглионарного аксона генерирует короткий возбуждающий (т. е. вызывающий потенциал действия) постсинаптический потенциал, тогда как постганглионарный аксон вызывает медленный возбуждающий или ингибиторный постсинаптические потенциалы. Синапсы преганглионарного типа можно стимулировать никотином так же успешно, как и ацетилхолином (рис. 8.4), и поэтому их называют никотиновыми холинэргическими синапсами. В постганглионарных синапсах действие ацетилхолина может быть заменено не никотином, а мускарином, токсином мухомора *Amanita muscaria*. Они называются мускариновыми холинэргическими синапсами. Оба типа синапсов имеют свои селективные ингибиторы: никотиновые синапсы ингибирует яд кураре или его основной активный

компонент d-тубокурарин, тогда как мускариновые синапсы ингибирует атропин — токсин красавки *Atropa belladonna* (рис. 8.4). Другие фармакологические и биохимические различия этих синапсов обсуждаются в разделе, посвященном рецепторам. Нейромышечная концевая пластинка принадлежит к никотиновому холинэргическому типу.

Отдельные стадии химической синаптической передачи

Когда потенциал действия достигает нервного окончания, он вызывает путем деполяризации высвобождение медиатора. Последний диффундирует через синаптическую щель к постсинаптической мембране, вызывая изменения ее ионной проницаемости и, следовательно, мембранного потенциала (гл. 5). Это в свою очередь может приводить к генерации потенциала действия.

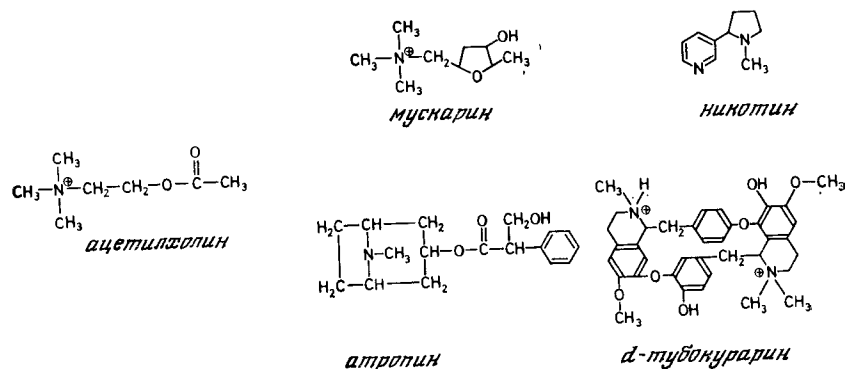


Рис. 8.4. Холинэргические лиганды и агонисты ацетилхолина мускарин и никотин и антагонисты мускаринового и никотинового холинэргических синапсов.

Сейчас мы кратко остановимся на сложной последовательности отдельных молекулярных событий судьбы нейромедиатора. Молекула медиатора, например ацетилхолина, проходит через следующие стадии своего существования:

- 1) синтез медиатора;
- 2) загрузка нейромедиатора в везикулу. В том случае, когда первая и вторая стадии протекают в перикарионе, происходит аксоплазматический транспорт везикулы к нервному окончанию;
- 3) слияние везикул с пресинаптической мембраной при деполяризации и высвобождение медиатора (*экзоцитоз*);
- 4) диффузия медиатора к постсинаптической мембране;
- 5) узнавание медиатора и связывание его со специфическим рецептором, например с мембранным белком постсинаптической

мембраны, сопровождающееся воздействием медиатора на ионный канал или фермент постсинаптической мембраны;

6) инактивация медиатора, которая приводит к ограничению длительности пресинаптического сигнала. Такая инактивация происходит либо путем ферментативной деградации медиатора, либо путем его обратного поглощения пресинаптической мембраной.

Таким образом, цикл завершается и возвращается ко второй стадии (или к первой, если клеткой поглощается продукт деградации инактивированного медиатора).

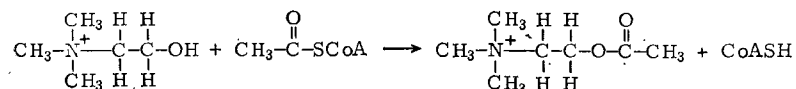
Таково общее описание синаптической функции. Биохимию специфических структур и молекулярных процессов лучше проследить на конкретных примерах. Наиболее полно изучен холинэргический синапс, и поэтому мы его и рассмотрим первым. Затем опишем другие медиаторы, их биосинтез, биологическую функцию и фармакологию, а уже потом приведем сведения о рецепторах. В заключение обсудим пластичность синапсов и специфичность синаптических соединений.

Никотиновый холинэргический синапс

Первая стадия ацетилхолинового цикла — синтез ацетилхолина из ацетилкофермента А (ацетил-CoA) и холина (рис. 8.2). Ацетил-CoA является конечным продуктом гликолиза. Он образуется в митохондриях при окислительном декарбоксировании пирувата, катализируемом мультиферментным комплексом пируватдегидрогеназы. Поскольку ацетил-CoA не может проникать через митохондриальную мембрану, необходим его не прямой перенос в цитоплазму, где будет синтезироваться ацетилхолин. Пока неясно, происходит ли в нервной ткани такой же самый процесс, как, например, в жировых тканях, где ацетил-CoA реагирует с оксалилацетатом, образуя цитрат; последний транспортируется из митохондрий и в цитоплазме расщепляется АТФ-цитратлиазой, вновь образуя ацетил-CoA и оксалилацетат. Эксперименты с ^{14}C -меченным цитратом показали, однако, что в нервной ткани ни цитрат, ни ацетат не используются в качестве источников ацетилхолина, и вопрос об его источнике остается открытым. По-видимому, в любом случае нервная ткань должна содержать отдельный пул ацетил-CoA [5].

Второй компонент ацетилхолина — холин. Сам по себе он не синтезируется в нервных окончаниях, а поступает туда из межклеточного холинового пула. Холин образуется главным образом в печени из фосфатидилхолина, синтезируемого из фосфатидилэтаноламина посредством серии реакций метилирования (гл. 2). Холин возникает также при деградации липидов, и его концентрации в мозге достигают ~ 20 мкМ.

Холин реагирует с ацетилхолинэстеразой, образуя ацетилхолин



Реакция катализируется ферментом холинацетилтрансферазой (ChAT), открытым Д. Нахманзоном. Найдено, что этот белок с M 65 000 бывает в зависимости от вида организма как растворенным в цитоплазме, так и более или менее прочно связанным с мембранами перикарионов, аксонов и нервных окончаний. Фермент синтезируется в теле клетки и передается к нервному окончанию посредством «быстрого аксонального транспорта» со скоростью ~ 190 мм/сут (показано на блуждающем нерве кролика). Длительное время «полусуществования» фермента (12—20 сут) указывает на то, что он пребывает в клетке постоянно и не высвобождается при нервном возбуждении. Как ChAT, так и ацетилхолин распределяются по всему нейрону, но особенно высока их концентрация в нервном окончании. Пока еще не установлено, в какой мере аксональный транспорт отвечает за поставку медиатора, но транспорт ацетилхолина, а также везикул (см. ниже) уже доказан (гл. 10).

Ацетилхолин «упакован» в везикулы

Де Робертис и Беннет в 1955 г. открыли в нервном окончании сферические структуры — так называемые *синаптические везикулы* (рис. 8.3). Они предположили, что эти структуры действуют как органеллы, содержащие запасенный медиатор, который, как установили Кастильо и Кац на основании своих работ по миниатюрным потенциалам концевых пластинок, высвобождается дискретными квантами при нервном возбуждении, а также спонтанно в состоянии покоя. Постсинаптические потенциалы всегда кратны этому кванту (гл. 5). Синаптические везикулы были выделены, и наличие в них ацетилхолина определено одновременно лабораториями Уиттейкера и Де Робертиса в 1963 г. Остался лишь вопрос, высвобождался ли медиатор непосредственно в синаптическую щель или попадал туда через цитоплазму. Мы еще вернемся к этой проблеме при обсуждении механизма высвобождения медиатора, а здесь опишем только, как ацетилхолин попадает в запаасающие его везикулы.

Информацию об этом дает биохимический анализ везикул. Они содержат АТФ и ацетилхолин в высокой концентрации и при молекулярном соотношении 1:5. Такой высокий уровень АТФ, видимо, указывает на механизм поглощения ацетилхолина путем активного транспорта. Этот факт, однако, еще не дока-

зан. В везикулярной мембране электрического ската *Torpedo* имеется Mg^{2+} -зависимая АТРаза, а так как этот фермент активируется ацетилхолином, то, возможно, он и действует как «медиаторный насос». Во всяком случае, механизм активного транспорта кажется совершенно необходимым, так как концентрация ацетилхолина в везикулах очень высока и составляет 0,2—0,6 М в зависимости от вида организма.

Как же ацетилхолин попадает в синаптическую щель?

В одном из элегантных экспериментов молекулы ацетилхолинэстеразы (ацетилхолингидролизующего фермента) вводили в синаптические везикулы. Это приводило к ингибированию синаптической передачи и, таким образом, демонстрировало, что в процессе пресинаптического высвобождения участвует медиатор, запасенный в везикулах. В другом эксперименте ацетилхолинэстеразу вводили в аксоплазму холинэргических нейронов *Aplysia*, где синаптическая передача снова тормозилась. На этот раз гидролизовался ацетилхолин, запасенный не в везикулах, а в цитоплазме. Взаимосвязь цитоплазматического и везикулярного ацетилхолиновых пулов еще не вполне ясна, однако общепринято, что высвобождение медиатора (и спонтанное, и стимулированное) происходит непосредственно из самих везикул, которые сливаются с пресинаптической мембраной и выделяют в зависимости от ткани от 2000 (кора головного мозга морской свинки) до 200 000 (электрический орган *Torpedo*) молекул ацетилхолина на везикулу [7].

Эта гипотеза подтверждается электронными микрофотографиями фиксированных препаратов, на которых видны многие стадии при ассоциации и слиянии везикул с пресинаптической мембраной (рис. 8.7).

Остается ответить лишь на вопрос о несоответствии между количеством молекул ацетилхолина в везикуле и величиной миниатюрного потенциала концевых пластинок. Известно, что беспозвоночным для мышечного ответа необходим квант, содержащий от 10 000 до 12 000 молекул ацетилхолина.



Рис. 8.7. Электронная микрофотография слияния синаптической везикулы с пресинаптической мембраной — возможное свидетельство экзоцитотического высвобождения нейромедиатора [Sci. Am. 236, 107 (1977)]. (Воспроизводится с разрешения издательства.)

Экзоцитоз — эндоцитоз

Слияние пузырьков не предполагает постоянного включения везикулярной мембраны в пресинаптическую мембрану, так как даже после длительного стимулирования, т. е. после слияния большого количества везикул, площадь поверхности мембраны возрастает только временно. Если в синаптической щели при стимуляции присутствует пероксидаза, то ее вскоре находят и в синаптических везикулах. Это доказывает, что слившиеся везикулярные мембраны быстро образуют пузырьки путем эндоцитоза и при этом поглощают или захватывают внеклеточный материал.

Роль кальция

Причиной высвобождения ацетилхолина является деполяризация нервного окончания в результате достигающего его потенциала действия. Однако в отсутствие ионов кальция во внеклеточном пространстве высвобождения медиатора не происходит. Мы уже упоминали, что ионы кальция влияют и на пороговую величину потенциала действия. Сейчас кажется очевидным, что они играют ключевую роль в химической синаптической передаче. Деполяризация нервного окончания увеличивает проницаемость мембраны для ионов кальция и, следовательно, их внутриклеточную концентрацию. Однако кальций, попадающий в нервное окончание, должен выделиться снова, если стимуляция синапса временно прекращается. Имеются многочисленные доказательства того, что внутриклеточная концентрация кальция регулируется митохондриями и такими белками, как кальмодулин и кальциневрин (гл. 7). Митохондрии располагают очень эффективным кальциевым насосом, а ингибиторы митохондриальной функции вызывают, кроме того, количественное увеличение миниатюрного потенциала концевой пластинки, что также свидетельствует об ингибировании поглощения кальция митохондриями. Неясно, куда именно кальций переносится митохондриями с тем, чтобы они сами не перенасытились этими ионами. Еще меньше известно о молекулярном механизме кальциевой стимуляции высвобождения медиатора. Высказаны соображения о вкладе актомиозинподобного комплекса, но экспериментальных доказательств этого еще нет. Зависимость кальциевого эффекта от его концентрации показывает, что несколько ионов (возможно, четыре) кооперативно активируют высвобождение кванта медиатора. Ионы Mg^{2+} конкурируют с

ионами Ca^{2+} за место действия, т. е. магний ингибирует Ca^{2+} -зависимое высвобождение медиатора, хотя сам и не в состоянии функционировать как активатор.

По-видимому, относительно медленное удаление кальция, который входит в клетку при деполяризации, отвечает за такие явления, как «облегчение» и «послететаническое потенцирование», когда после одного потенциала действия последующий вызывает более сильный постсинаптический потенциал благодаря повышенной концентрации уже имеющихся ионов кальция (гл. 11).

Ацетилхолин связывается с постсинаптической мембраной

Как молекула нейромедиатора, высвобождающаяся из пресинаптической мембраны, достигает постсинаптической мембраны? Напрашивается простой ответ — посредством диффузии. Но здесь необходимо объяснить, как медиатор диффундирует мимо многочисленных молекул ацетилхолинэстеразы, которые присутствуют в синаптической щели и теоретически могли бы гидролизовать во много раз большие количества высвобожденного медиатора, сделав, следовательно, невозможным его взаимодействие с постсинаптической мембраной. Предполагается, что этому препятствуют либо структурные особенности вещества синаптической щели — базальной мембраны, которое, возможно, образует каналы, либо временное ингибирование ферментативной активности эстеразы, вероятно, из-за ее взаимодействия с постсинаптической мембраной или из-за насыщения субстратом. Выказано также предположение, что эстераза не присутствует в щели, т. е. на пути диффузии ацетилхолина, а находится в постсинаптической мембране, но такая модель не доказана [8].

На следующей стадии нейромедиатор взаимодействует с постсинаптической мембраной. Резкое изменение ионной проницаемости мембраны происходит благодаря связыванию медиатора, который управляет воротным механизмом ионных каналов. Хотя такое объяснение и выглядит простым, на самом деле предложенному механизму соответствует очень непростой биохимический процесс. Здесь мы обсудим два сложных аспекта этого процесса, а именно:

- 1) его специфичность и
- 2) молекулярный механизм изменения проницаемости.

Под специфичностью действия медиатора может пониматься: 1) субстратная специфичность, которая означает, что только молекулы со специфической структурой способны действовать как медиаторы; и 2) специфичность действия, связанная с тем, что медиатор может открывать или закрывать поры только для одного вида ионов (K^+ , Na^+ или Cl^-) или для двух

Таблица 8.1. Специфичность ацетилхолинового рецептора AChR^a [29]

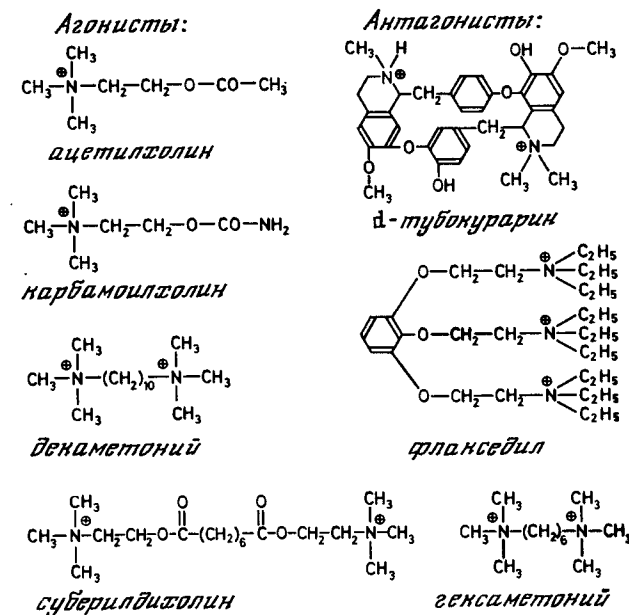
Клетка	Действие	Изменения электрической ионной проводимости	Тип рецептора	Действие α -бунгаротоксина
Позвоночные				
Скелетная мышца	d	$\uparrow$ Na, K	n	+
Пластинка электрического органа	d	$\uparrow$ Na, K	n	+
Сердце	h	$\uparrow$ K	m	—
Гладкая мышца	d	$\downarrow$ Na (K, Ca)	m	—
Симпатический ганглий				
быстрый e. p. s. p.	d	$\uparrow$ Na, K	n	—
медленный e. p. s. p.	d	$\downarrow$ K или $\uparrow$ Na, Ca	m	—
медленный i. p. s. p.		$\downarrow$ Na		
Нейроны коры	d	$\downarrow$ K	m	
Беспозвоночные				
Нейроны улитки:				
быстрый e. p. s. p.	d	$\uparrow$ Na, K	n	—
	d	$\uparrow$ Cl		
быстрый i. p. s. p.	h	$\uparrow$ Cl	n	+
медленный i. p. s. p.	h	$\downarrow$ K		—
Нейроны пиявки	d	$\uparrow$ Na	n	—
	h	$\uparrow$ Cl	m	—
Мышцы пиявки	d		n	—+
Нейроны насекомых	d	$\uparrow$ Na	n, m	—

^a d — деполяризация, h — гиперполяризация; $\uparrow$ увеличение проводимости, $\downarrow$ снижение проводимости; n — никотиновый AChR; m — мускариновый AChR; n/m — AChR с никотиновыми и мускариновыми свойствами; «плюс» обозначает ингибирование; «минус» — отсутствие ингибирования; остальные обозначения см. в гл. 5 (разд. «Выводы»).

ионов одновременно ($K^+ + Na^+$) в соответствии с функцией данного синапса (табл. 8.1). Здесь речь пойдет преимущественно о нейромышечном синапсе, в котором ацетилхолин открывает каналы, общие для Na^+ и K^+ , но, кроме того, будут упомянуты и другие функции этого медиатора.

Ацетилхолин обеспечивает местную деполяризацию нейромышечной пластинки, т. е. появление потенциала концевой пластинки. Те соединения, которые оказывают на нее такое же действие, как и природный медиатор, называются *агонистами*, а вещества, ингибирующие действие агонистов, называются *антагонистами* (рис. 8.8). Постсинаптическая мембрана должна обладать структурами, которые могут точно идентифицировать и дифференцировать эти соединения. Связывающий, или рецепторный, белок (подобно ферменту) в специальном активном центре связывает низкомолекулярный лиганд с высоким сродством и селективностью. Это связывание обратимо, т. е. процесс ассоциации — диссоциации медиатора и рецептора находится в равновесии.

Биохимически наиболее полно изучен белоксвязывающий медиатор нейромышечного синапса — ацетилхолиновый рецептор (гл. 9). Причина этого состоит в том, что встречающиеся в природе электрические рыбы содержат такой рецептор в необыкновенно высоких концентрациях, благодаря чему они оказались исключительно ценными для нейрехимии. Электрические органы электрического угря *Electrophorus* и электрического ската *Torpedo* эволюционно развились из мышечной ткани, они равномерно холинэргически иннервированы и содержат белок никотинового ацетилхолинового рецептора в миллиграммовых количествах. Эти органы широко использовались в качестве



очевидно, что их связывающие центры должны быть ориентированы наружу, т. е. в направлении синаптической щели. Методом электронной микроскопии показано, что там они так плотно упакованы (10 000—30 000 связывающих центров/мкм²), что едва ли найдется место для других белков; наибольшее количество таких центров расположено на экспонированных участках вмяченной мембраны. Вне синапса плотность рецепторов составляет всего лишь 1% их плотности в субсинаптической области. После денервации путем перерезания нерва плотность рецепторов, однако, заметно возрастает*.

Полипептидная цепь, содержащая центр связывания, имеет M 40 000 ($\pm 10\%$). Этот полипептид соединяется с другими полипептидными цепями, функции которых неизвестны, образуя рецепторный комплекс с M 260 000**. Ацетилхолиновый рецептор высших позвоночных, по-видимому, имеет такие же молекулярные свойства [10].

В результате взаимодействия медиатора и рецептора открывается пора на время ~ 1 мс, и за это время через нее проходит $\sim 5 \cdot 10^4$ ионов натрия и калия. Механизм открывания поры является предметом многих работ. Предложены две возможные модели этого процесса, причем первая из них наиболее вероятна в случае ацетилхолинового рецептора:

1) связывание лиганда вызывает конформационное изменение рецепторного белка, которое в свою очередь приводит к изменению ионной проницаемости. Этот эффект может быть как прямым, т. е. состоять в том, что рецептор сам содержит пору, открывающуюся при таком конформационном изменении, так и опосредованным — взаимодействием связывающего белка с другим, ионофорсодержащим белком, которому такое конформационное изменение передается;

2) рецептор является регуляторной субъединицей фермента, например киназы, которая путем фосфорилирования меняет электростатические свойства и тем самым проницаемость мембраны.

Наличие конформационных изменений рецепторного белка было доказано тем, что после связывания лиганда менялась флуоресценция остатков триптофана. Наблюдались также фосфорилирование и дефосфорилирование белков постсинаптической мембраны (холинэргической и др.). Однако корреляцию наблюдаемых конформационных изменений или реакций фос-

* Такая сверхчувствительность в результате денервации (гл. 9) наблюдалась пока только в мышцах позвоночных, но не у *Torpedo*.

** Эти данные определены методом электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия. Секвенирование кДНК (гл. 12) дает несколько более высокие значения (50 200 для цепи, связывающей агонист, и 268 000 для полного рецепторного комплекса).

форилирования с изменениями ионной проводимости еще предстоит изучить. Очевидно также, что приведенные модели не исключают одна другую.

Инактивация нейромедиатора посредством ферментативного гидролиза

Постсинаптический потенциал длится всего несколько миллисекунд, если он не усиливается дополнительным высвобождением молекул медиатора, а концентрация ацетилхолина в синаптической щели уменьшается в результате диффузии и гидролиза. Медиатор инактивируется ферментом ацетилхолинэстеразой (КФ 3.1.1.7), который был выделен в кристаллическом состоянии Нахманзоном [8] и является одним из наиболее часто обновляющихся ферментов.

Ацетилхолинэстераза — это периферический мембранный белок, т. е. она может быть проэкстрагирована из мембраны растворами с высокой ионной силой. В какой именно мембране находится этот фермент, неясно. Его локализация в субсинаптической области постсинаптической мембраны кажется достаточно сомнительной; во-первых, из-за высокой плотности рецепторных белков там недостаточно места для локализации подходящего количества фермента и, во-вторых, при субфракционировании синаптических мембран центрифугированием в градиенте плотности сахарозы ацетилхолинэстераза и ацетилхолиновый рецептор были найдены в разных мембранных фракциях. Это указывает, следовательно, на то, что ацетилхолинэстераза связана не с постсинаптической мембраной, а с базальной пластинкой между пре- и постсинаптическими мембранами. Фермент имеет трехспиральный «хвост» и «головку», образованную тремя тетрамерами. Хвост отщепляется трипсином и, что интересно, коллагеназой; коэффициент седиментации молекулы уменьшается при этом с 18S до 11S. Коллагеназа осуществляет специфическое расщепление только по связям, образованным карбоксильной группой пролина, а аминокислотный анализ хвостовой части фермента свидетельствует о содержании в нем до 15% пролина и редких аминокислот гидроксипролина и гидроксипролина. Эти результаты указывают на коллагеноподобную структуру фермента и на его сходство с базальной мембраной, ведущей свое происхождение от волокон коллагена.

Фермент состоит из четырех, вероятно, идентичных полипептидных цепей с M 80 000. Каждая цепь имеет активный центр и один или более периферических, видимо регуляторных, связывающих участков. Активный центр содержит анионный участок, который связывает положительно заряженную четвертич-

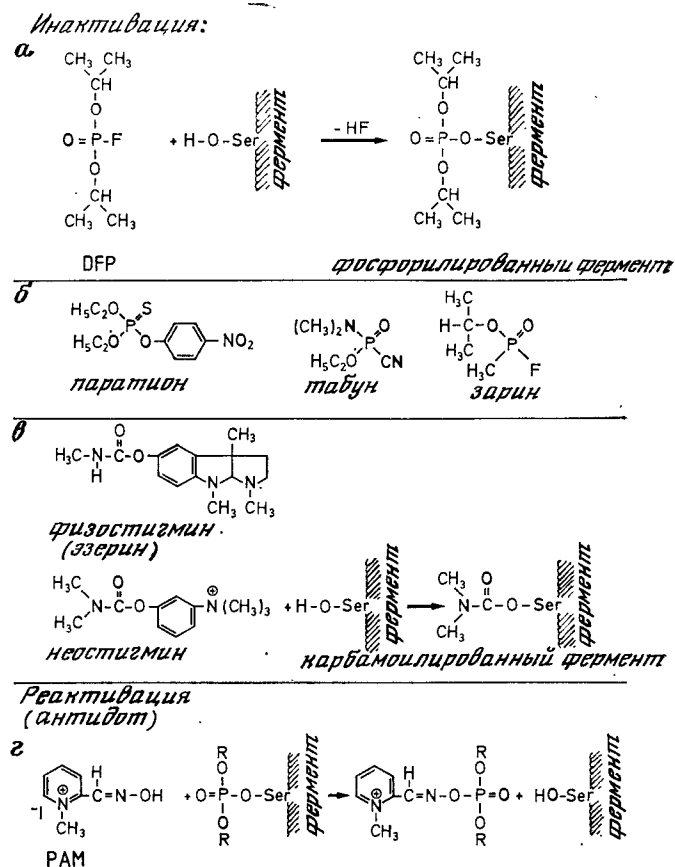


Рис. 8.9. Инактивация и реактивация ацетилхолинэстеразы. Инактивация: а — диизопропилфторофосфатом (ДФР); б — другими органофосфатами, вызывающими подобную реакцию; в — эзерин, карбамоилирующим реагентом. Реактивация: г — антидотом альдоксимного типа.

ную аммониевую группу субстрата, и реакционный участок, катализирующий гидролиз сложноэфирной связи ацетилхолина. Функциональной группой, ответственной за гидролиз, является здесь ОН-группа остатка серина, нуклеофильные свойства которой усиливаются имидазольным кольцом соседнего остатка гистидина. Нуклеофильная атака сериновой группой ОН приводит к ацетилированию фермента. Скорость этой многостадийной реакции определяет стадия деацилирования белка с образованием свободного фермента.

Ингибиторы ацетилхолинэстеразы могут взаимодействовать либо с активным центром, либо с периферическими связываю-

щими участками фермента. Будучи сериновой эстеразой, фермент необратимо инактивируется сильным нервнопаралитическим отравляющим веществом — диизопропилфторофосфатом (ДФР) (рис. 8.9).

Это соединение, как и другие органофосфаты, найденные при разработке химического оружия или пестицидов, блокирует активный центр фермента путем ковалентного связывания с реакционноспособным остатком серина. Здесь можно упомянуть также пестицид паратион (Е 605), являющийся аналогом диизопропилфторофосфата. Реактивацию фермента можно осуществить с помощью антидотов, впервые разработанных в лаборатории Нахмансона и содержащих реакционноспособную альдоксимную группировку $-\text{CH}=\text{NOH}$ [например, пиридинальдоксимом (2-РАМ)]; особенно активны соединения бипиридинового типа, например токсогонин (обидоксимхлорид).

Другая группа ингибиторов, таких, как эзерин и неостигмин, инактивирует этот активный участок фермента обратимо путем карбамоилирования гидроксильной группы серина. Образующиеся соединения представляют собой замещенные эфиры карбаминовой кислоты, и реакция реактивации фермента протекает медленно. Эти антихолинэстеразные агенты используются для временного ингибирования эстеразы с целью пролонгирования или усиления действия ацетилхолина.

Кроме таких ковалентно связывающихся ингибиторов, есть другая группа эффекторов ацетилхолинэстеразы, которые реагируют не с ее эстеразным центром, а благодаря наличию в них четвертичной аммониевой группы с анионным центром фермента (рис. 8.10). Где находится место связывания таких эффек-

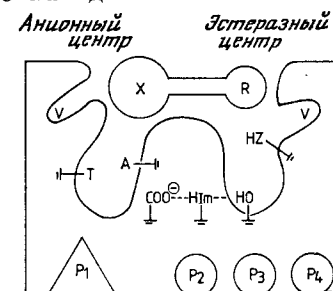


Рис. 8.10. Модель ацетилхолинэстеразы. Фермент содержит активный центр и, возможно, многие периферические связывающие участки для различных эффектов (P₁—P₄). Активный центр состоит из анионной группы ($-\text{COO}^-$), которая реагирует с четвертичной аммонийной группой ацетилхолина, и гидроксильной группы серина, непосредственно участвующей в эстеразном действии фермента. Последнее активируется «системой переноса заряда», которая в ходе катализа переносит протон через имидазольное кольцо остатка гистидина. Обозначения: V — гидрофобная область; HZ — кислая группа, X—R — субстрат [11].

Таблица 8.2. Стадии цикла передачи сигнала в холинэргических синапсах и их ингибиторы

№ стадии	Стадии химической синаптической передачи	Ингибитор
1	Синтез нейромедиатора	Производные стирилипидина
2	Пресинаптическое высвобождение медиатора	Ботулинический токсин, β -бунгаротоксин, Mg^{2+}
3	Связывание медиатора с рецептором	α -Бунгаротоксин, кураре и др.
4	Ионный транспорт	Местные анестетики (например, прокаин, лидокаин), гистрионикотоксин
5	Гидролиз медиатора	Диизопропилфторофосфат и др. органофосфаты, эзерин
6	Поглощение холина	Гемихолиний

торов — в активном центре (конкурентные ингибиторы) или на периферии (неконкурентные ингибиторы), часто зависит от концентрации ингибитора и ионной силы. Соединением, относительно селективно действующим на активный центр, является эдрэфоний, известный фармакологам как тенсилон; флакседил (галламин) и пропидий специфически действуют на периферические связывающие центры (рис. 8.8); пропидий используется также в качестве флуоресцентной метки-лиганда для связывающего центра.

Ацетилхолинэстеразу следует отличать от так называемых псевдохолинэстераз (КФ 3.1.1.8), которые обычно проявляют только количественные различия от нее по субстратной и ингибиторной специфичности. Псевдохолинэстеразы найдены в сыворотке, их физиологическая функция неизвестна, но показано, однако, что они не участвуют в синаптической передаче.

Цикл ацетилхолина завершается инактивацией медиатора путем гидролиза и поглощения получающегося холина пресинаптической мембраной. Подробно эти процессы и их возможная роль в пластических изменениях синапса описаны в гл. 9.

Ингибиторы отдельных стадий синаптической передачи

Для каждой стадии химической синаптической передачи существуют селективные ингибиторы (табл. 8.2 и рис. 8.6). С их помощью можно выделить *in vivo* каждую отдельную стадию синаптической передачи, так что синапс действительно был буквально «анатомирован» с помощью фармакологических препаратов.

Пресинаптически действующие соединения — это ингибиторы высвобождения медиатора — β -бунгаротоксин (см. ниже) и бо-

тулинический токсин, и ингибитор обратного поглощения холина — гемихолиний (НС-3). Инактивация медиатора путем гидролиза тормозится ингибиторами ацетилхолинэстеразы. Вещества, действующие постсинаптически, можно разделить на две группы. Соединения одной группы, например рецепторные антагонисты типа кураре и α -нейротоксины из змеиных ядов кобры и крайта, блокируют связывание медиатора и рецептора. Другая группа соединений, по-видимому, имеет отношение к событиям, протекающим вслед за образованием медиатор-рецепторного комплекса. Сюда относятся, например, местные анестетики, такие, как прокаин (рис. 8.11) и токсины животных типа, например, гистрионикотоксина, выделенного из кожи некоторых колумбийских лягушек. Они действуют как *неконкурентные антагонисты*, блокирующие ионный транспорт через постсинаптические мембраны и не конкурирующие с медиатором за участие связывания на рецепторе.

Ингибиторы играют важнейшую роль при нейрохимической характеристике синаптических молекул *in vitro*. Типичными примерами ингибиторов являются нейротоксины из яда змей. Благодаря работам Ли большие количества чистого α -бунгаротоксина и его радиоактивного ^{125}I -меченого производного стали доступными, что в свою очередь способствовало значительному прогрессу в понимании постсинаптических механизмов.

Нейротоксины ядов змей

Яды змей содержат большой набор токсических соединений. Здесь мы меньше внимания уделим кардиотоксинам, которые из-за своих лизирующих свойств вызывают местные повреждения, сердечно-сосудистые изменения или лизис красных кровя-

Местные анестетики:

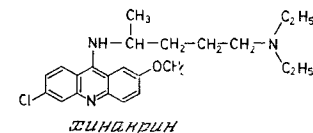
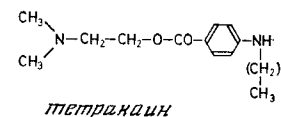
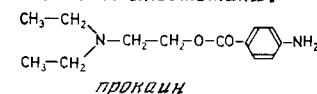


Рис. 8.11. Местные анестетики: два типичных вещества, широко применяемых в медицине (прокаин и тетракаин) и хинакрин, который благодаря своей сильной флуоресценции используется в качестве зонда для исследования участков связывания и механизма действия местных анестетиков на возбуждаемую мембрану.

ных клеток. Остановимся же мы подробнее на нейротоксинах, которые за последние несколько лет стали ценными инструментами при получении биохимических характеристик рецепторов. Особенно хорошо изучены нейротоксины кобры (например, *Naja naja*, *N. naja siamensis*) и крайта (*Bungarus multicinctus*, *B. ceruleus*) семейства Elapidae и морских змей (например, *Laticauda semifasciata*) семейства Hydrophiidae.

Значение этих токсинов для анализа молекулярных процессов в синапсе зависит от их специфичности к определенной мишени воздействия. По действию на никотиновые холинэргические синапсы они классифицируются следующим образом:

α -нейротоксины, которые, подобно кураре, ингибируют постсинаптические рецепторы;

β -нейротоксины, ингибирующие пресинаптическое высвобождение молекулы медиатора.

В зависимости от первичной структуры α -нейротоксины подразделяются на нейротоксины типа I — полипептиды с $M \sim 6800$, состоящие из 61—62 аминокислотных остатков и нейротоксины типа II — полипептиды с $M \sim 7800$, состоящие из 71—74 остатков. Третичные структуры нейротоксинов типа I стабилизируются четырьмя дисульфидными связями, типа II — пятью. Когда эти связи расщепляются восстановлением, пептид теряет токсичность. Нейротоксины семейства Hydrophiidae принадлежат к типу I и имеют аминокислотные последовательности, близкие токсинам типа I семейства Elapidae. Их третичные структуры также очень близки.

Известны первичные структуры многих α -нейротоксинов [12], а некоторые структуры определены рентгеноструктурным методом. Первой из них была установлена третичная структура кристаллического эрабутоксина морской змеи *Laticauda semifasciata* (рис. 8.12) [13, 14]; полипептидная цепь этого токсина образует три петли, которые стабилизируются дисульфидными, а также водородными связями. Более крупные токсины кобры типа II имеют аналогичную форму [15]. Одна из этих трех петель содержит все аминокислотные остатки, необходимые для проявления токсичности, и, вероятно, отвечает также за связывание с постсинаптической мембраной.

Молекулярный механизм действия нейротоксинов змей до сих пор неизвестен. α -Нейротоксины связываются с ацетилхолиновым рецепторным белком с высоким сродством ($K_D < 10^{-9}$ М) и, таким образом, ингибируют связывание агонистов. α -Бунгаротоксин крайта практически необратимо связывается с никотиновым ацетилхолиновым рецептором ($K_D = 10^{-11}$ М). Здесь участвует много участков нековалентного взаимодействия; такое многоточечное связывание обуславливает, видимо, и низкую K_D , и токсичность [16].

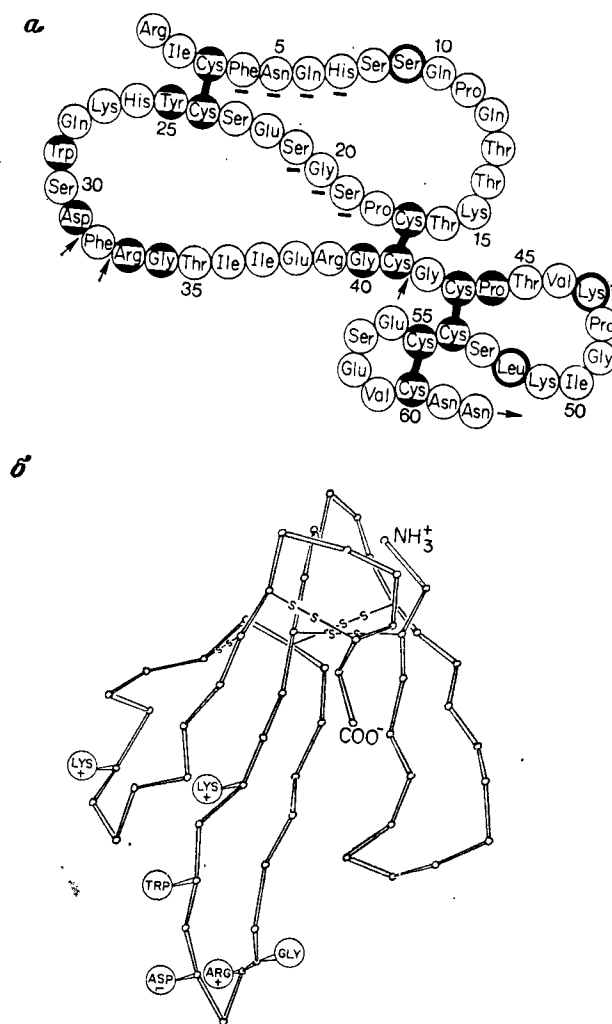


Рис. 8.12. α -Нейротоксин из змеиного яда. Эрабутоксин, показанный здесь, по структуре аналогичен α -бунгаротоксину и α -нейротоксину кобры. а — первичная структура с четырьмя дисульфидными связями, существенными для его токсического действия; б — третичная структура, полученная методом рентгеноструктурного анализа [13, 14]. (Воспроизводится с разрешения Elsevier-North-Holland.)

Другие нейромедиаторы: критерии отнесения и классификация

Холинэргические синапсы — это еще не все синапсы, а ацетилхолин — не единственный медиатор; известны уже многие, но, очевидно, отнюдь не все вещества, которые можно считать нейромедиаторами (трансмиттерами). Нейромедиаторами являются, например, катехоламины (допамин, адреналин и норадреналин), аминокислоты (γ -аминомасляная (GABA), глицин, а также, возможно, глутаминовая и аспарагиновая), серотонин (5-гидрокситриптамиин, или 5-НТ) и гистамин. Недавно стал расти интерес к отдельным пептидам, таким, как вещество Р и энкефалины, которые представляются перспективными кандидатами на роль медиаторов. Остаются некоторые сомнения относительно нейромедиаторной роли пролина, таурина и пуриновых нуклеотидов (таких, как, например, АТР). Для такого рода «сомнительных» соединений существует термин *предполагаемый медиатор* (трансмиттер) или *кандидат в медиаторы* (трансмиттеры). Многие соединения модулируют синаптическую передачу, не будучи нейромедиаторами. Далеко недостаточным критерием является и то, что они высвобождаются в пресинаптической мембране и действуют на постсинаптическую. Для отнесения соединения к медиаторам необходимо соблюдение следующих условий:

1) соединение (и его метаболитические предшественники) должно содержаться в соответствующем нейроне и в более высокой концентрации в нервном окончании;

2) нейрон должен содержать ферменты для синтеза этого соединения, а в нервном окончании должен действовать механизм его высвобождения;

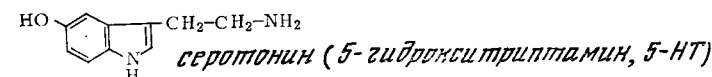
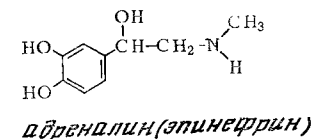
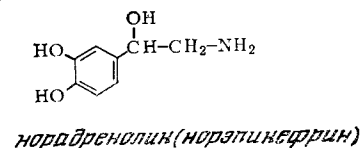
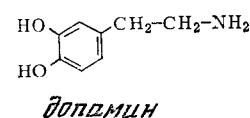
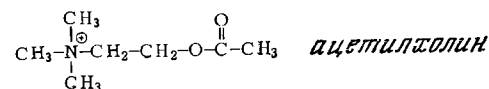
3) данное соединение должно высвобождаться при стимуляции нейрона; должно быть доказано его присутствие во внеклеточном пространстве;

4) должна существовать система инактивации этого соединения: фермент или механизм поглощения;

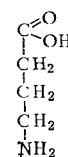
5) должно быть показано наличие специфических рецепторов в пресинаптической области и в большей концентрации в субсинаптической;

6) соединения, поступающие извне, должны оказывать такое же действие, как стимуляция нерва; в частности, активность лекарственных препаратов, например специфических антагонистов, не должна зависеть от того, вводится медиатор извне или возникает в нерве.

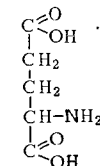
Только около полудюжины веществ удовлетворяют всем этим критериям (рис. 8.13), другие остаются лишь кандидатами (рис. 8.14). Итак, резюмируя, определим нейромедиатор как



Аминокислоты:



γ -аминомасляная
кислота (GABA)

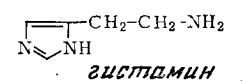
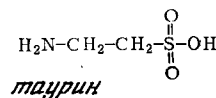


глутаминовая
кислота



глицин

Рис. 8.13. Нейромедиаторы.



Другие возможные кандидаты: АТР, аспарагиновая кислота, пролин

Рис. 8.14. Предполагаемые нейромедиаторы.

соединение, которое синтезируется и запасается в нейроне, высвобождается при проведении нервного импульса и специфически связывается постсинаптической мембраной, где оно активирует или ингибирует постсинаптическую клетку посредством деполяризации и гиперполяризации соответственно.

Нейропептиды: медиаторы и гормоны

Пока еще нет достаточных данных, чтобы определить, какие из нейропептидов, приведенных на рис. 8.15, являются медиаторами, а какие модуляторами. Но все они представляют особый интерес, поскольку проявляют обе функции, действуя в качестве медиаторов специфических синапсов и в качестве модуляторов, или регуляторов, в других частях организма. Мы уже отмечали, что органами коммуникации внутри организма являются нервная и гормональная системы. Нейропептиды функционируют, по-видимому, в обеих системах. Прежде чем мы вернемся к рассмотрению «классических» нейромедиаторов, познакомимся с некоторыми примерами нейропептидов (рис. 8.15).

Нейромедиатор может проявлять несколько функций

Классификация медиаторов как стимуляторных или ингибиторных нецелесообразна, так как их функция зависит от конкретного синапса и постсинаптического рецептора. Ацетилхолин, например, является стимулирующим медиатором в нейромышечной концевой пластинке, и в то же время проявляет ингибирующее действие в синапсе между блуждающим нервом и волокном сердечной мышцы. Мы уже упоминали о различии между никотиновыми и мускариновыми ацетилхолиновыми рецепторами. Однако на примере *Aplysia* было показано, что функция медиатора может оказаться еще более сложной. У этого организма имеется по крайней мере три типа холинэргических синапсов, или ацетилхолиновых рецепторов: два ингибиторных и один возбуждающий. Ингибиторные синапсы различаются по ионной специфичности: на одной постсинаптической мембране ацетилхолин увеличивает проницаемость для ионов калия, а на другой — для ионов хлора, в обоих случаях вызывая гиперполяризацию мембраны. На возбуждающем синапсе ацетилхолин вызывает деполяризацию, открывая натриевые каналы. Аналогичная двойная функция описана для медиаторов дофамина и серотонина. Поэтому можно сказать только то, что ацетилхолин и глутамат, как правило, являются стимулирующими медиаторами, а глицин, γ -аминомасляная кислота и норадреналин — ингибиторными.

Tyr-Gly-Gly-Phe-Met	Met-энкефалин
Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu	Leu-энкефалин
Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH ₂	вещество P
P-Glu-Leu-Tyr-Glu-Asn-Lys-Pro-Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu	нейротензин
Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Thr-Ser-Glu-Lys-Ser-Gln-Thr-Pro-Leu-Val-Thr-Leu-Phe-Lys-Asn-Ala-Ile-Val-Lys-Asn-Ala-His-Lys-Lys-Gly-Gln	β -эндорфин
Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Tyr-Gly-Lys-Pro-Val-Gly-Lys-Lys-Arg-Arg-Pro-Val-Lys-Val-Tyr-Pro-Asp-Gly-Ala-Glu-Asp-Glu-Leu-Ala-Glu-Ala-Phe-Pro-Leu-Glu-Phe	ACTH (кортикотропин)
Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-NH ₂	ангиотензин II
Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly-NH ₂	окситоцин
Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly-NH ₂	вазопрессин
His-Ser-Asp-Ala-Gln-Met-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Lys-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn-NH ₂	вазоактивный кишечный полипептид (VIP)
Ala-Gly-Cys-Lys-Asn-Phe-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys	соматостатин
P-Glu-His-Pro-NH ₂	тиреолиберин (THR)
P-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH ₂	люлиберин (LHRH)
P-Glu-Gln-Arg-Leu-Gly-Asn-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH ₂	бомбезин
Ala-His	карнозин
Asp-Tyr-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH ₂	холецистокининподобный пептид

Рис. 8.15. Некоторые нейропептиды [30]. Охарактеризовано уже много нейропептидов, и их число постоянно растет.

В большинстве случаев, если не во всех, каждый нейрон использует только один медиатор. Это утверждение известно (несправедливо) как принцип Дейла*.

Развитие современных аналитических методов, таких, как автордиография и иммунофлуоресценция, показали, однако, что несколько нейропептидных медиаторов могут присутствовать в качестве нейромодуляторов в одном аминергическом нейроне. Этот факт, хотя он и не совместим с принципом Дейла, без сомнения, не противоречит его правильному толкованию.

Катехоламины

Хорошо установлено, что катехоламины допамин, норадреналин и адреналин (последние два известны в научной литературе США как норэпинефрин и эпинефрин соответственно) — это нейромедиаторы. Мы кратко рассмотрим их биосинтез, структуру, функцию и влияние нейрофармакологических препаратов на их действие.

Синтез катехоламинов строго регулируется

Название катехоламин происходит от пирокатехина (*орто*-замещенного дигидроксибензола), остаток которого является общим для всех трех соединений. Исходным веществом при их биосинтезе (рис. 8.16) служит аминокислота тирозин, получаемая либо гидроксилированием фенилаланина, либо непосредственно из пищи. Первой и скоростьюопределяющей стадией, главной для регуляции их биохимического синтеза, является гидроксилирование тирозина до дигидроксифенилаланина (DOPA) ферментом тирозингидроксилазой (КФ 1.14.16.2). Далее DOPA декарбоксилируется с помощью декарбоксилазы (КФ 4.1.1.26), а образующийся допамин превращается в норадреналин допамин-β-гидро-

* Та идея, что нейрон использует один и тот же медиатор во всех своих окончаниях, была названа Экклсом «принципом Дейла». Позднее стало модным ссылаться на этот принцип как на постулат, утверждающий, что каждый нейрон высвобождает только один медиатор. Однако такой постулат никогда не выдвигался ни Дейлом, ни Экклсом. Сегодня было бы невозможно рассматривать как достаточное доказательство даже получение данных, что во многих нейронах найдено более одного медиатора и показано их высвобождение. В настоящее время неизвестно ни одного случая, когда нейрон использовал бы один медиатор на одном своем окончании и другой — на другом, хотя в принципе это возможно. Определение «принцип Дейла» следует относить лишь к гипотезе, предполагающей, что нейрон высвобождает один и тот же медиатор на всех своих окончаниях. (Обсуждение этого вопроса, который имеет не только исторический интерес, см. в [Whittaker V. P., What is Dale's Principle? in: Dale's Principle and Communication between Neurons, Osborne N. N. (ed.), p. 1—5, Pergamon Press, Oxford and New York, 1983].)

ксилазой (КФ 1.14.2.1). Последний из трех катехоламинов образуется в результате метилирования норадреналина с помощью фермента фенилэтанол-амин-N-метилтрансферазы, использующего S-аденозилметионин в качестве донора метильных групп. Как уже отмечалось, наиболее интересной стадией в последовательности метаболических реакций является лимитирующая стадия, в данном случае — стадия, катализируемая тирозингидроксилазой (рис. 8.17). Будучи «тем-п-задающим ферментом», эта гидроксилаза регулируется разнообразными механизмами.

Тирозингидроксилаза найдена только в надпочечниках и в катехоламинергических нейронах, причем преимущественно в их нервных окончаниях. В качестве кофакторов она использует

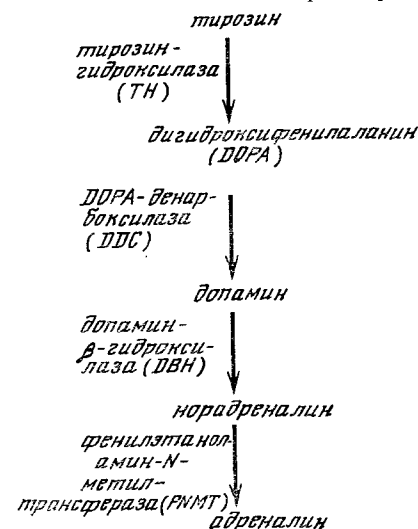


Рис. 8.16. Биосинтез катехоламинов.

птеридин (тетрагидробиоптерин), Fe^{2+} и молекулярный кислород и по принципу обратной связи регулируется конечным продуктом — норадреналином. Помимо такого аллостерического контроля, для нее обнаружена регуляция посредством фосфорилирования и дефосфорилирования как в надпочечниках, так и в различных областях мозга. В таком регулировании, очевидно, принимает участие сАМР-зависимая протеинкиназа. В результате фосфорилирования понижается K_m для кофактора птеридина и уменьшается сродство к ингибитору обратной связи, а следовательно, происходит активация фермента. Фосфорилирование включается при функциональной активности нейронов.

Кроме аллостерической регуляции и фосфорилирования, активность тирозингидроксилазы и некоторых других белковых

ферментов регулируется индукцией на уровне хромосом. Более подробная информация по этому вопросу приведена в гл. 11.

Фермент, участвующий на второй стадии, DOPA-декарбоксилаза, декарбоксилирует также предшественник серотонина 5-гидрокситриптофан. Пока неясно, идентичен ли этот фермент широко распространенной декарбоксилазе ароматических аминокислот. Ферменту требуется пиридоксальфосфат (витамин B₆) в качестве кофермента. Он найден не только в нервных тканях, но также, например, в печени и почках.

Дофамин-β-гидроксилаза, напротив, содержится только в адренэргических клетках и может рассматриваться как их специфический маркерный фермент. Это медьсодержащий фермент, локализованный главным образом в *хромаффинных гранулах*, т. е. катехоламинзапасающих везикулах мембран (см. ниже).

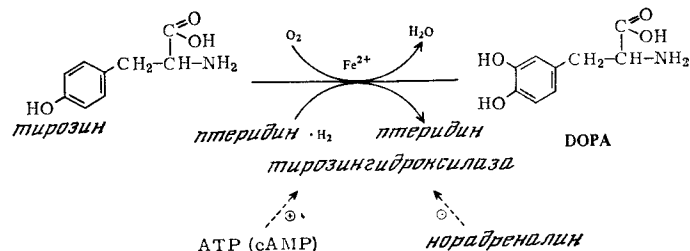


Рис. 8.17. Катализируемая тирозингидроксилазой реакция и ее регуляция.

Как дофамин-β-гидроксилаза, так и DOPA-гидроксилаза присутствуют в избытке, и даже, 95%-ное ингибирование последней [с помощью, например, N-метилдигидроксифенилаланина (метил-DOPA) или α-метил-м-тирозина (α-ММТ)] не влияет на концентрацию катехоламина в мозге.

Мы описали только основной путь синтеза катехоламина. Более полная схема метаболизма, приведенная на рис. 8.18, иллюстрирует также связь с другими соединениями, классифицируемыми пока как *предполагаемые медиаторы*, подобно, например, октопамину. Некоторые из этих аминов, присутствующих обычно в следовых количествах, как, например, фенилэтиламин, при синтезе в аномально высоких концентрациях в ЦНС могут вызывать психические заболевания.

Катехоламины также «упакованы» в везикулы

Подобно ацетилхолину катехоламины запасаются в везикулах и в качестве медиаторов симпатических нервов высвобождаются из утолщений этих нервов. Методом электронной микроскопии обнаружены две популяции везикул: обе популяции имеют

ядро с высокой электронной плотностью и отличаются по размеру; их называют *большими и малыми везикулами с плотным ядром*. Малые везикулы доминируют. Физиологическое значение этих двух типов популяций везикул пока не выяснено. Большие везикулы, по-видимому, возникают в теле клетки и достигают нервного окончания путем аксонального транспорта. Установлено, что каждая везикула содержит ~10 000—15 000 молекул норадреналина.

Биохимия катехоламинзапасающих везикул, найденных в надпочечниках и названных *хромаффинными гранулами*, исследована более полно [17]. Предполагается, что их цикл подобен циклу везикул, запасующих нейромедиатор. Они содержат

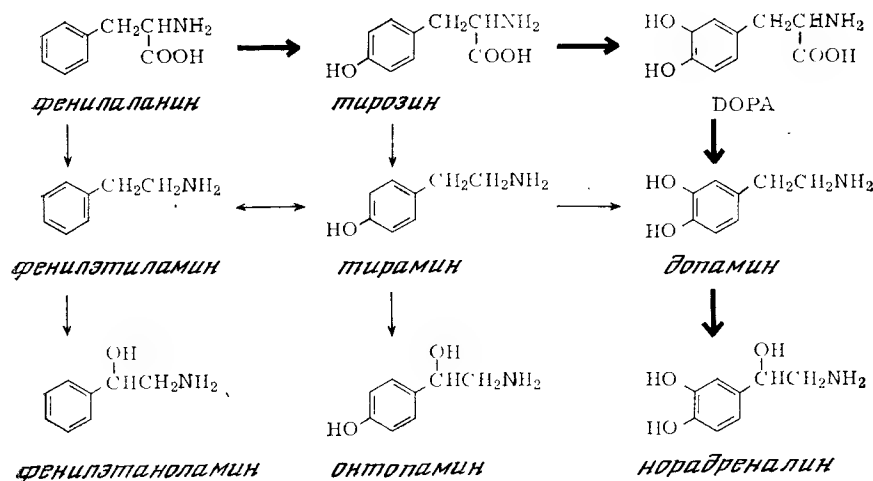


Рис. 8.18. Пути метаболизма катехоламинов (основной путь выделен).

жестко упакованные вещества высокой и низкой молекулярной массы. Кроме катехоламинов, везикулы содержат АТФ (в меньших количествах АДФ и АМР) и ионы кальция. Нуклеотиды и катехоламины транспортируются в везикулы отдельными носителями под действием градиента рН, генерируемого электрогенным АТФ-насосом. В качестве высокомолекулярных компонентов хромаффинных гранул идентифицирована группа кислых секреторных белков *хромогранинов* и меньшие количества дофамин-β-гидроксилазы — главного компонента везикулярной мембраны. Как растворимый секреторный, так и мембранно-связанный белок содержат мукополисахариды.

In vivo дофамин, по-видимому, поглощается везикулами и там превращается дофамин-β-гидроксилазой в норадреналин.

Частично норадреналин покидает везикулы и в цитозоле дегидрируется до адреналина, который затем поглощается гранулами.

Высвобождение и связывание

Подобно ацетилхолину, катехоламины высвобождаются из пресинаптической мембраны посредством экзоцитоза и связываются постсинаптически с рецепторными белками. Эти рецепторы, видимо, не связаны непосредственно с ионными каналами, как в случае никотиновых ацетилхолиновых рецепторов, а вместо этого взаимодействуют с ферментом аденилатциклазой, продукт которой, вторичный мессенджер сАМР, в дополнение к другим своим функциям опосредованно регулирует ионную проницаемость постсинаптической мембраны. Такое взаимодействие с рецептором может носить либо активирующий, либо ингибиторный характер, что приводит к увеличению или снижению концентрации сАМР в клетке-мишени.

В гл. 9 мы подробнее опишем взаимодействие между рецептором и ферментом и другие биохимические свойства катехоламиновых рецепторов. Здесь же достаточно упомянуть, что, подобно ацетилхолиновым рецепторам периферической нервной системы, катехоламиновые рецепторы делятся на два класса: α и β . Их различили друг от друга около 30 лет назад; классификация основана на фармакологических свойствах. Адреналин имеет много мест воздействия на симпатическую нервную систему (см. ниже); имеется целый ряд «симпатомиметических соединений», проявляющих замечательную селективность (рис. 8.19).

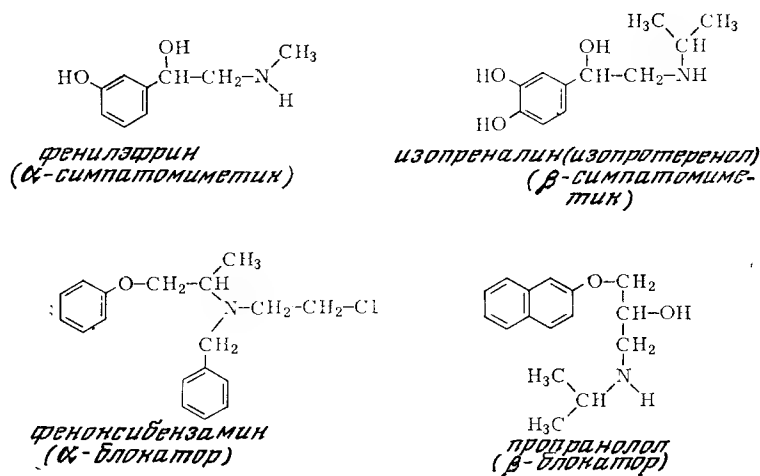


Рис. 8.19. Эффекторы α - и β -рецепторов.

Фенилэфрин, например, в основном стимулирует адренэргические рецепторы, а изопренилин — β -адренэргические. Селективность антагонистов еще более заметна: феноксифензамин является почти исключительно α -блокатором, а пропранолол, альпронолол и пиндолол — это специфические β -блокаторы. Среди α -блокаторов известны также алкалоиды спорыньи — производные лизергиновой кислоты.

Многочисленные рецепторы обеспечивают вариабельность действия медиаторов

Как мы увидим в гл. 9, специфичность и разнообразие эффектов, вызываемых относительно небольшим количеством нейромедиаторов, присутствующих в нервной системе, значительно возрастает благодаря механизму *многожественных рецепторов*. Так, например, α - и β -рецепторы подразделяются на α_1 и α_2 , β_1 и β_2 . Имеются D_1 - и D_2 -рецепторы в допаминэргических и H_1 - и H_2 -рецепторы в гистаминэргических окончаниях. Мускариновый и никотиновый ацетилхолиновый рецепторы и μ -, κ - и δ -опиатные рецепторы представляют собой другие примеры этого общего принципа.

Различные типы адренэргических эффектов

Адреналин может играть роль как возбуждающего, так и тормозного медиатора (табл. 8.3), но это двойное действие не имеет ничего общего с подразделением на α - и β -рецепторы. Так, адреналин, вызывая сокращение мышечных волокон сердца, ускоряет частоту сердечных сокращений. Участвующий в этом процессе рецептор был идентифицирован как β_1 -рецептор. Однако адреналин действует и на β_2 -рецепторы радужной оболочки глаза, гладких мышц бронхов и сосудов крови, приводя к их расслаблению. В общем случае α -рецепторы участвуют в сокращении гладких мышц, исключение составляют гладкие мышцы пищеварительного тракта, где эффект заключается в их расслаблении.

Взаимосвязи в центральной нервной системе неясны по существу, и пока неизвестно, приложима ли здесь вообще классификация на α - и β -рецепторы [18, 19].

Инактивация катехоламинов посредством поглощения и деградации

Адренэргический синапс использует свой медиатор более экономично, чем холинэргический. Хотя он и имеет механизм деградации катехоламинов (ср. холинэргические синапсы, которые

Таблица 8.3. Типы рецепторов в различных органах и их ответ на действие адренергических веществ [32]

Орган или система органов	Тип рецептора	Ответ	Действие ^а		
			NA	A	I
Сердце	β	Увеличение частоты и силы сокращений сердца, уменьшение скорости проведения импульса	3	2	1
Кровеносные сосуды	α	Сокращение	1	2	0
Кровеносные сосуды мышц, печени и сердца	β	Расширение	3	2	1
Бронхи, гладкие мышцы	β	Расслабление	3	2	1
Мышцы внутренних органов:					
продольные, круговые сфинктеры	α, β	Расслабление	2	1	0
	α	Сокращение	2	1	3
Мочевой пузырь					
Detrusor vesicae	β	Расслабление	3	2	1
Trigonum vesicae (сфинктер)	α	Сокращение	2	1	3
Матка	α, β	Сокращение-расслабление			
Глаз					
M. radialis (расширитель)	α	Сокращение	2	1	0
M. ciliaris	β	Расслабление	3	2	1
Слюнные железы					
секреторные клетки	β	Секреция			
многослойные эпителиальные клетки	α	Сокращение			

^а NA — норадреналин, A — адреналин, I — изопроterenол; действие: 1 — сильное, 2 — промежуточное, 3 — слабое, 0 — никакого действия.

разлагают ацетилхолин), большее количество высвобожденных катехоламинов используется фактически повторно. Катехоламины реабсорбируются из синаптической щели в нервное окончание посредством специального механизма поглощения и снова упаковываются в везикулы. Часть их, конечно, подвергается метаболическим превращениям: характерная для них аминогруппа удаляется окислительным дезаминированием, а одна из гидроксильных групп пирокатехинового кольца метилируется до или после дезаминирования. Окислительное дезаминирование происходит на митохондриальной мембране, где имеется флавиновый фермент моноаминоксидаза (MAO, КФ 1.4.3.4). Цитоплазматический фермент пирокатехин-О-метилтрансфераза (COMT, КФ 2.1.1.6) катализирует метилирование с использова-

нием S-аденозилметионина в качестве донора метила и ионов магния как кофактора.

Высокая активность MAO обнаружена не только в нервной ткани. Существуют также изоферменты MAO A и MAO B, различающиеся по субстратной и ингибиторной специфичности. Фермент типа A дезаминирует преимущественно норадреналин и серотонин и чувствителен к ингибитору клоргиллину. Фермент B дезаминирует следовые количества аминов фенилэтиламина и бензиламина и ингибируется депренилом. Очевидно, MAO A и MAO B являются продуктами различных генов, так как их субъединицы имеют различные размеры (M 60 000 и 55 000) и после протеолиза дают различные пептидные карты [21].

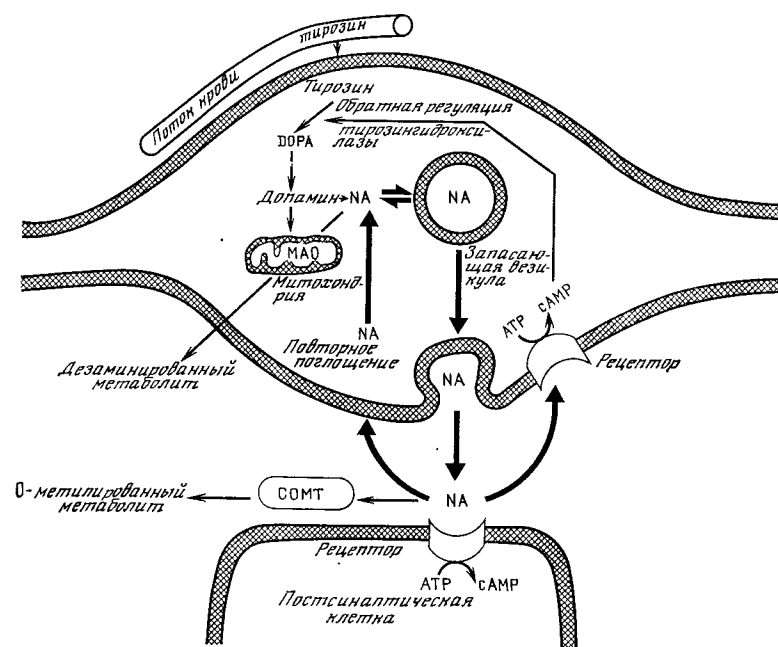
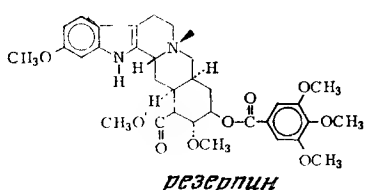
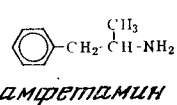
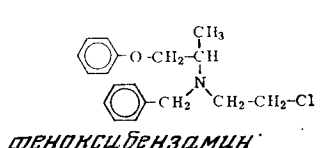
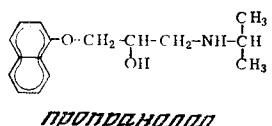
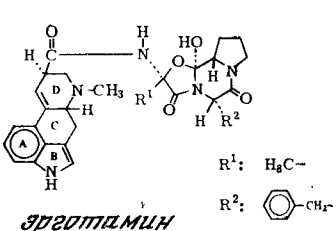
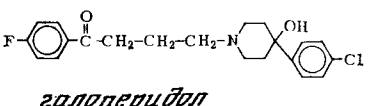
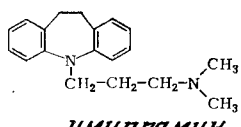
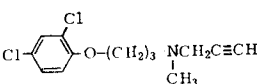


Рис. 8.20. Схематическое изображение утолщения норадренергического нейрона [31].

Кроме катехоламинов — эндогенных регуляторов метаболизма, имеются и экзогенные факторы, которые могут вызывать активацию и ингибирование. В табл. 8.4 (а также на рис. 8.20) представлены некоторые из этих соединений. Их используют в клиниках для изменения концентрации или характера действия катехоламинов. Например, лечение блокаторами MAO — анти-

Таблица 8.4. Отдельные стадии рециркуляции медиатора в адренэргических синапсах и их ингибиторы

№ стадии	Стадия химической синаптической передачи	Ингибитор	
1	Синтез медиатора (тирозин-гидроксилаза)	α -Метил- <i>n</i> -тирозин	
2	Запасание медиатора	Резерпин, тетрабензанин	 <i>резерпин</i>
3	Пресинаптическое высвобождение	Амфетамин (стимуляторы)	 <i>амфетамин</i>
4	Связывание с рецептором	α -Блокатор (феноксизамин)	 <i>феноксизамин</i>
		β -Блокатор (пропранолол)	 <i>пропранолол</i>
		Эргоалкалоид (эрготамин)	 <i>эрготамин</i> R¹: H₃C- R²: 
		Галоперидол	 <i>галоперидол</i>
		Фенотиазин (блокатор допаминового рецептора)	
5	Повторное поглощение	Имипрамин, амфетамин, кокаин	 <i>имипрамин</i>
6	Дегградация медиатора с помощью MAO	Клоргилин, депренил	 <i>клоргилин</i>
7	Инактивация медиатора с помощью COMT	Трополон	

депрессантами приводит к увеличению уровня серотонина и катехоламинов. Мы еще вернемся к наиболее интересным примерам в этой области.

Серотонин

5-Гидрокситриптамин (серотонин, 5-НТ) наряду с катехоламинами относится к аминэргическим медиаторам. За исключением аминокетильной группы, между ними, однако, мало общего. Самые веские доказательства медиаторной роли серотонина получены при электрофизиологических исследованиях улиток, но вполне вероятно, что он действует и как медиатор центральной нервной системы высших организмов, включая млекопитающих. У человека он найден в различных отделах головного мозга (мозговом стволе, варолевом мосту, ядрах шва) и в еще более высоких концентрациях — в кишечнике, тромбоцитах крови и

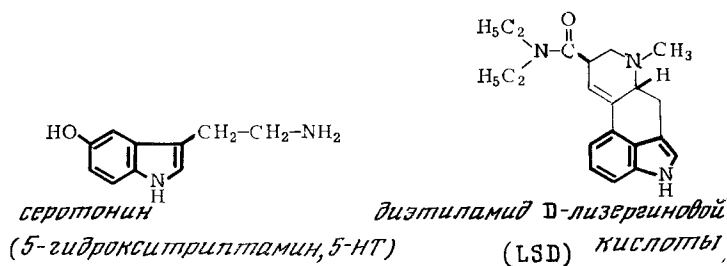


Рис. 8.21. Формулы серотонина и LSD (выделена общая часть их структуры — индольное кольцо).

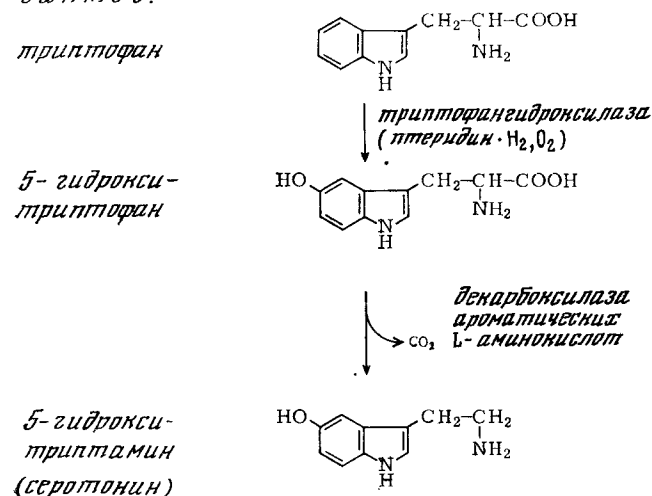
тучных клетках. Его функция неизвестна. Видимо, серотонин играет некоторую роль в регуляции сна, а на участие в нервных основах сознания указывает его взаимодействие с галлюциногеном — диэтиламидом лизергиновой кислоты (LSD). LSD действует как антагонист при связывании с рецепторами серотонина, но это не определяет в полной мере его механизма действия, так как он одновременно ингибирует также синтез серотонина. Эти эффекты обусловлены подобием молекулярных структур этих соединений: оба они содержат индольное кольцевую систему (рис. 8.21). Как и эргоалкалоиды, LSD является агонистом дофамина.

Синтез серотонина из триптофана и его деградация при помощи MAO

Серотонин образуется из аминокислоты триптофана путем гидроксилирования в положение 5 и последующего декарбоксилирования (рис. 8.22). Первая стадия процесса катализируется

ферментом триптофангидроксилазой (КФ 1.14.16.4), которому, как и тирозингидроксилазе, необходим молекулярный кислород и восстановленный птеридин в качестве кофакторов. Декарбоксилирование до индоламина катализируется тем же ферментом, который осуществляет декарбоксилирование ДОПА. Недостаточная специфичность этого фермента заставляет думать,

Синтез:



Деградация:

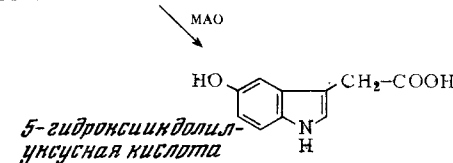


Рис. 8.22. Синтез и деградация серотонина.

что ему гораздо лучше подходит название «декарбоксилаза ароматических аминокислот», чем 5-НТ-декарбоксилаза (КФ 4.1.1.28).

Цикл серотонина аналогичен циклам других нейромедиаторов

По крайней мере в центральной нервной системе высших организмов серотонин принадлежит к группе предполагаемых медиаторов и поэтому его метаболический цикл не может быть описан с той же определенностью как циклы ацетилхолина и

катехоламинов. В препаратах нервной ткани большую часть серотонина находят в связанном состоянии, например упакованной в синаптические везикулы. Он высвобождается при стимуляции соответствующих отделов мозга, а изучение его связывания указывает на существование специфических рецепторов (гл. 9). Поскольку свободный серотонин ингибирует дальнейшее его высвобождение как медиатора, то представляется вероятным, что его экзоцитоз регулируют не только постсинаптические, но и пресинаптические рецепторы.

Нейтральные аминокислоты (в основном ингибиторные)	Кислые аминокислоты (возбуждающие)
$\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$ <i>γ-аминомасляная кислота</i> (GABA)	$\begin{array}{c} \text{HOOC}-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$ <i>глутаминовая кислота</i>
$\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$ <i>глицин</i>	$\begin{array}{c} \text{HOOC}-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$ <i>аспарагиновая кислота</i>
$\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$ <i>β-аланин</i>	
$\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SO}_3\text{H} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$ <i>таурин</i>	

Рис. 8.23. Аминокислоты — медиаторы.

Имеются также данные о наличии Na^+ -зависимого *высоко-аффинного поглощения*, которое отвечает за инактивацию этого медиатора путем его удаления из синаптической щели. Фармакология отдельных стадий серотонинового цикла исследована слабо. Мы уже упоминали здесь механизм действия LSD. *n*-Хлорофенилаланин представляет собой сильный ингибитор триптофангидроксилазы и благодаря такой специфичности используется для определения участия серотонина в том или ином типе поведения.

Аминокислоты-нейромедиаторы: GABA, глицин и другие

Аминокислотные медиаторы подразделяются на две группы: возбуждающие кислые (глутамат и аспартат) и ингибиторные нейтральные (γ -аминомасляная кислота, глицин, β -аланин и таурин). В соответствии с нашими критериями отнесения к медиаторам наиболее яркие представители этого класса — глицин и GABA [22] (рис. 8.23).

Ингибиторный медиатор — γ -аминомасляная кислота

Приоритет в идентификации GABA как нейромедиатора принадлежит Бейзеуму, Эллиоту и Флори. Они нашли в сенсорном нерве рецептора растяжения ракообразных ингибиторный эфферентный компонент и продемонстрировали, что экстракт мозга человека действует аналогичным образом. Позднее это позволило выделить и идентифицировать GABA в качестве активного биорегулятора. В мозге позвоночных GABA был наиболее четко идентифицирован как медиатор клеток Пуркинью мозжечка, а также многих ингибиторных промежуточных нейронов, например полосатого тела, спинного мозга и коры. GABA образуется из L-глутаминовой кислоты путем декарбоксилирования. Это соединение находится в телах клеток ингибиторных нейронов в концентрациях 10 мМ, а в их аксонах — в концентрациях 100 мМ. Поэтому метаболизм GABA представляет собой трудную задачу для клеток. Основные количества предшественника GABA — глутамата образуется из α -кетоглутарата путем трансаминирования и, таким образом, берет начало в цикле лимонной кислоты. После декарбоксилирования с помощью пиридоксальфосфатзависимого фермента L-глутаматдекарбоксилазы (КФ 4.1.1.5) углеродный скелет GABA вновь поступает в цикл Кребса. Там GABA деградируется посредством трансаминирования, при котором ее NH_2 -группа переносится на другую молекулу L-кетоглутарата с образованием глутамата. Остающийся полуальдегид янтарной кислоты окисляется до сукцината. Синтез и деградация являются, таким образом, дополнительной «петлей» в цикле Кребса, называемой шунтом GABA. Энергетически метаболизм по схеме этого шунта невыгоден, так как окисление α -кетоглутарата до сукцината происходит здесь без образования GTP, тогда как в нормальном цикле Кребса оно сопровождается фосфорилированием GDP.

Связь между метаболизмом GABA, L-глутамата, L-аспартата и L-аланина и циклом Кребса показана на рис. 8.24. Интересно, однако, отметить, что синтез и деградация GABA происходят, по-видимому, в разных компартментах клетки. Так, если животным вводить мощные ингибиторы и глутаматдекар-

боксилазы (синтезирующего фермента), и GABA-трансаминазы (деградирующего фермента), например гидроксиламин, то ингибируется только деградация GABA и ее концентрация возрастает. Шунт GABA представляет собой, по-видимому, мостик между двумя компартментами клетки, в одном из которых, вероятно в нервных окончаниях, GABA синтезируется; после выделения GABA деградирует в другом компартменте, который может находиться в глиальных клетках [23].

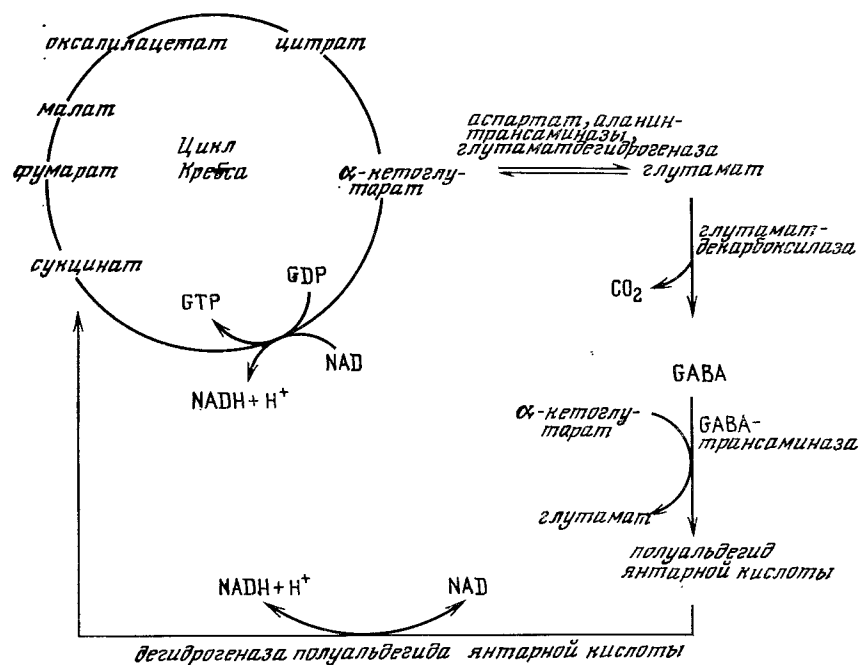


Рис. 8.24. Метаболизм (шунт) GABA.

GABA регулирует каналы хлор-ионов

GABA относят к ингибиторным медиаторам членистоногих и позвоночных. Ингибирование заключается в предотвращении деполяризации постсинаптической мембраны, необходимой для появления потенциала действия, и происходит оно либо путем гиперполяризации, либо по крайней мере путем стабилизации потенциала покоя. GABA осуществляет это посредством увеличения проводимости для ионов Cl⁻; рецепторы GABA, подобно глициновым, связаны, по-видимому, с хлорными каналами (гл. 9).

Антагонисты GABA вызывают судороги

Если ингибирующее действие GABA-эргических нейронов снижается, то это приводит к неконтролируемой активности связанных с этим медиатором нервных связей. Антагонисты GABA, например пикротоксин и бикукуллин (рис. 8.25), являются, следовательно, мощными конвульсантами. В то же время не все вещества, действующие как конвульсанты, являются антагонистами GABA, поскольку они могут препятствовать действию других ингибиторных медиаторов (см. ниже). Вещества, усиливающие ингибиторный эффект GABA, являются релаксантами и транквилизаторами. Наиболее известны среди них диазепины, например валиум (седуксен) (гл. 9).

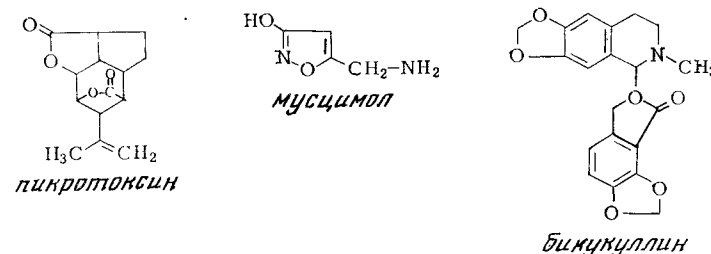


Рис. 8.25. Антагонисты GABA (конвульсанты) и агонист мусцимол из яда мухомора. (У бикукулина связь верхней циклической структуры с нижней осуществляется не через кислород, а через группу СН, связанную также с эфирным кислородом.)

Глицин — еще один ингибиторный нейромедиатор

Глицин проявляет примерно такое же ингибиторное действие, как GABA. Он стабилизирует потенциал покоя, повышая Cl⁻проводимость синаптической мембраны. Обе эти аминокислоты анатомически локализованы в различных, но иногда перекрывающихся отделах центральной нервной системы. Глицин — это, по-видимому, основной ингибиторный медиатор спинного мозга и ствола головного мозга, тогда как GABA чаще находят в мозге. Хлорные каналы этих двух рецепторов тоже, вероятно, не идентичны. Конвульсант стрихнин, неконкурентный антагонист глицинового синапса, взаимодействует непосредственно с его хлорными каналами (гл. 9), но в тех же концентрациях не влияет на хлорную проводимость, регулирующую GABA.

О биохимии и фармакологии глицина как медиатора известно немного, хотя и имеются некоторые данные об его стимулированном пресинаптическом высвобождении, связывании со специфическими рецепторами, о натрий-зависимой высокоаффинной системе обратного поглощения и о ферментах его синтеза и деградации.

Глутамат и аспартат: возбуждающие нейромедиаторы

Данные о функционировании глутаминовой и аспарагиновой аминокислот в качестве возбуждающих нейромедиаторов позвоночных и членистоногих довольно обстоятельны, хотя для глутамата они гораздо убедительнее. Известны мощные нефизиологические агонисты этих медиаторов, такие, как каиновая кислота — нейротоксин из японской водоросли, являющийся структурным аналогом глутамата (рис. 8.26). Отмечена также высокая концентрация глутамата во всей центральной нервной системе, и полагают, что он представляет собой наиболее распространенный возбуждающий медиатор.

Каиновая кислота и метод химических повреждений

Каиновая кислота — еще более мощный агонист, чем глутамат, хотя она, по-видимому, и не взаимодействует непосредственно с глутаматными рецепторами. Она нейротоксична и при инъекции

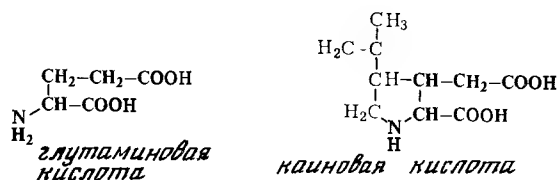


Рис. 8.26. Структурная аналогия между глутаминновой и канновой кислотами.

в центральную нервную систему вызывает дегенерацию нервных клеток, в которых селективно поражает только глутаминэргические нейроны, но не аксоны других нейронов. Ее, следовательно, можно использовать в нейроанатомии и нейрофизиологии для получения строго определенных и локализованных очагов повреждения. Повреждать ткани можно также, например, оперативным путем или с помощью тепловой коагуляции, но при таких методах трудно проконтролировать степень повреждения, особенно из-за того, что место операции может пронизываться аксонами, которые приходят издалека и, возможно, не имеют ничего общего с функцией данного отдела мозга. Химическое повреждение не влияет на такие аксоны. В результате инъекции каиновой кислоты можно проследить за изменениями поведения в ответ на повреждение тел клеток в месте инъекции и таким образом выяснить функции этих клеток. Аналогичные эксперименты по повреждению клеток проводились с 6-гидроксипапином — специфическим нейротоксином катехоламинэргических нейронов. Химические повреждения имеют все возрастающее значение для картирования функций мозга.

Энкефалины и другие нейропептиды: нейромодуляторы и предполагаемые нейромедиаторы

Опиаты — это лекарства с болеутоляющим и эйфорическим действием. В мозге были обнаружены специфические рецепторы этих лекарств, и фактически, как уже отмечалось, в настоящее время известно несколько типов опиатных рецепторов. Давно предполагалось, что должны существовать и эндогенные лиганды для этих рецепторов, но только в 1974 г. группами Костерлица и Хьюза и Терениуса и Валстрёма были открыты в экстрактах мозга пептиды, которые обладали свойствами, ожидаемыми для *эндогенных опиатов*. Пока еще неясно, являются ли эти пептиды истинными нейромедиаторами или просто нейромодуляторами; здесь приведен краткий обзор имеющихся по этому вопросу данных.

Выделены два аналогичных пентапептида, названных *энкефалинами*, и определены их аминокислотные последовательности:

Tyr-Gly-Gly-Phe-Met Met-энкефалин

Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu Leu-энкефалин

Для энкефалинов выполняются некоторые, но не все, основные критерии для медиаторов: с помощью флуоресцентных антител опиатные пептиды были определены гистохимически среди других тканей в дорсальном спинном мозге, т. е. в области, ответственной за проведение болевых сигналов. Они найдены в малых промежуточных нейронах, но не на главных нервных путях, где роль медиатора выполняет другой нейропептид — вещество Р (см. ниже). Это позволяет предположить, что опиатные пептиды могут ингибировать пресинаптическое высвобождение вещества Р (гл. 9). Высокие концентрации энкефалинов присутствуют также еще в одной области — в той части лимбической системы, которая, как известно, участвует в регуляции эмоций. Здесь выполняются и другие критерии для медиатора: высвобождение при электростимуляции и имитация электростимуляции вводимым извне пептидом. В качестве тест-систем, которые ингибируются эндогенными и экзогенными опиатами, использовались при этом сокращения подвздошной кишки морской свинки или семявыводящего протока мыши.

Опиатные рецепторы уже хорошо охарактеризованы как специфические медиаторные рецепторы (гл. 9). Опиатные пептиды конкурируют с синтетическими опиатами за участки связывания.

То немногое, что известно о биосинтезе опиатных пептидов (второе условие отнесения к медиаторам, с 212), может быть суммировано следующим образом.

Система инактивации этих предполагаемых медиаторов не идентифицирована (четвертое условие отнесения к медиаторам, с. 212). Механизма поглощения для них, по-видимому, нет, но имеются данные о протеолитической деградации, которая начинается с отщепления концевой тирозина.

Взаимосвязь между структурой и функцией в этом ряду соединений оказалось легче всего изучать на энкефалинах, поскольку их аналоги и производные легко синтезировать [25] (рис. 8.28). Если, например, пентапептид укоротить на N-концевой тирозин или C-концевой метионин, то его активность почти полностью теряется. Удлинение пептидных цепей приводит к тому же результату (за исключением β -эндорфина, для которого увеличение активности связано с приобретением большей устойчивости к протеолитической деградации).

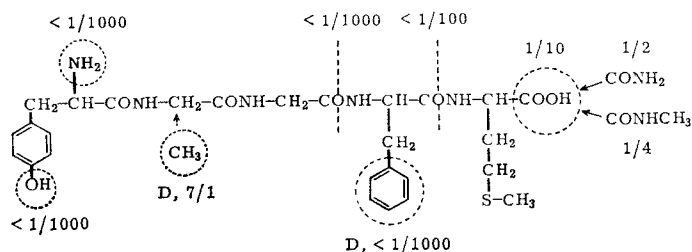


Рис. 8.28. Связь между структурой и активностью Мет-энкефалина. Дробки указывают на изменения активности после соответствующей модификации. Штриховые окружности обозначают отщепление или замену соответствующей функциональной группы; для фенилаланина это замещение на D-Phe, а для Gly — на D-Ala.

Далее было показано, что свободная концевая карбоксильная группа, гидроксильная группа тирозина, концевая аминогруппа и фенильная боковая цепь совершенно необходимы для проявления активности, как и правильное расстояние между остатками Phe и Tug. Активность возрастает только в случае замены глицина на D-аланин.

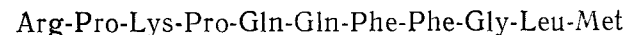
В данном случае активность означает анальгетический эффект *in vivo*. Он определяется не только эффективностью пептида в месте его действия, т. е. сродством к рецептору, но и устойчивостью к ферментативной деградации, а также скоростью транспорта пептида к месту его действия. Нестабильность большинства производных энкефалина усложняет проведение экспериментов по их связыванию и не дает прийти к определенным выводам относительно лиганд-рецепторных взаимодействий в этом случае.

Энкефалины в высоких концентрациях найдены в синапсоммах, и, возможно, они служат там ингибиторными медиатора-

ми. Постсинаптические и пресинаптические механизмы и их взаимодействие с аденилатциклазой обсуждаются в гл. 9. Здесь мы только отметим, что, подобно экзогенным опиатам, энкефалины также вызывают зависимость и привыкание, и «природное» вещество оказывается ничуть не лучше для организма, чем синтетическое лекарство.

Вещество P — самый «старый» известный нейропептид

Еще один пептид, который принадлежит к группе предполагаемых медиаторов, — это вещество P, известное уже полвека; оно представляет собой ундекапептид



Вещество P открыто в 1931 г. фон Эйлером и Гаддумом в экстрактах мозга и пищеварительного тракта. Было обнаружено, что оно вызывает сокращение гладких мышц кишечника и расширение кровеносных сосудов, причем для проявления эффекта у человека при внутривенном введении достаточно всего нескольких нанограммов пептида. Позднее вещество P, выделенное преимущественно из гипоталамуса, было очищено до гомогенного состояния. Его физиологическая роль пока не выяснена. Высвобождение этого пептида после сенсорной стимуляции было показано на дорсальном роговидном отростке спинного мозга. Как уже отмечено, этот процесс ингибируется энкефалином. Вещество P действует путем деполяризации постсинаптической мембраны и является, следовательно, медиатором сенсорной стимуляции. Символ P ведет свое происхождение от *англ.* powder — порошок; эту аббревиатуру стали интерпретировать как сокращение от *англ.* pain — боль [26].

Выводы

Синапсы — это места коммуникации нервных клеток. Химические и электрические синапсы различаются по механизму передачи информации.

Функции химического синапса:

1. Нервные импульсы передаются только в направлении от пресинаптической к постсинаптической мембране, и, таким образом, синапсы выполняют роль «выпрямителей» в процессах проводимости.

2. Синапсы — являются модуляторами и интеграторами нервных импульсов.

3. «Неспецифические» потенциалы действия трансформируются в специфические сигналы, т. е. в действие специфического медиатора на соответствующую постсинаптическую мембрану.

4. Синапсы — мишени действия эндогенных и экзогенных факторов, лекарств и токсинов. Роль «связного» в синапсе выполняет медиатор.

Критерии для отнесения вещества к медиаторам:

1. Соединение (и его метаболические предшественники) должны содержаться в нейроне.

2. Должны присутствовать ферменты для синтеза этого соединения и действовать механизм его высвобождения.

3. Медиатор должен высвобождаться при стимуляции нейрона, т. е. надо доказать его присутствие во внеклеточном пространстве.

4. Должна присутствовать система инактивации медиатора (фермент или механизм поглощения).

5. Действие вещества при введении извне должно быть таким же, как и его действие при высвобождении в результате стимуляции, в частности должно быть такое же взаимодействие с лекарствами.

Цикл медиатора: 1) синтез, 2) поглощение везикулами, 3) если первое и второе происходят в перикарионе, то эксплазматический транспорт к нервным окончаниям, 4) пресинаптическое высвобождение при деполяризации в синаптическую щель (экзоцитоз), 5) диффузия к постсинаптической мембране, 6) узнавание и связывание специфическим рецептором, например мембранным белком (чтобы включился воротной механизм постсинаптической мембраны), 7) инактивация.

Примеры известных веществ-медиаторов: четко идентифицированы амины: ацетилхолин, допамин, норадреналин и серотонин (5-НТ); менее четко — аминокислоты: γ -аминомасляная (ГАВА), глутаминовая и глицин; предполагаемые медиаторы или нейромодуляторы — гистамин, пуриновые нуклеотиды, энкефалины и другие нейропептиды. Объектом действия является рецепторный белок в постсинаптической мембране (иногда также и в пресинаптической мембране), и механизм действия состоит в изменении ионной проводимости возбудимой мембраны.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Goodenough D. A., The structure and permeability of isolated hepatocyte gap junctions, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **40**, 37—47 (1976).
2. Elfvén L. G., The ultrastructure of neuronal contacts, Prog. Neurobiol., **8**, 45—79 (1976).
3. DeFeudis F. V., Central Cholinergic Systems and Behaviour, Academic Press, London, New York, San Francisco, 1974.
4. Davis K. L., Berger P. A., Hollister L. E., Barchas M. D., Cholinergic involvement in mental disorders, Life Sci., **22**, 1865—1872 (1978).
5. Tucek S., The synthesis of acetylcholine. In: Handbook of Neurochemistry, Lajtha A. (ed.), 2nd edition, Vol. 4, p. 219—249, Plenum Press, New York, London, 1983.

6. Kuhar M. J., Murrin L. C., Sodium-dependent, high affinity choline uptake, J. Neurochem., **30**, 15—21 (1978).
7. Zimmermann H., Biochemistry of the isolated cholinergic vesicles. In: Neurotransmitter Vesicles, Klein R. L., Lagercrantz H., Zimmermann H. (eds.), p. 271—304, Academic Press, London, New York, 1982.
8. Nachmansohn D., Neumann E., Chemical and Molecular Basis of Nerve Activity, Academic Press, New York, 1975.
9. Conti-Tronconi M. B., Raftery M. A., The nicotinic cholinergic receptor. Correlation of molecular structure with functional properties, Ann. Rev. Biochem., **51**, 491—530 (1982).
10. Fambrough D. M., Control of acetylcholine receptors in skeletal muscle, Phys. Rev., **59**, 165—227 (1979).
11. Rosenberry R. L., Acetylcholinesterase, Adv. Enzymol., **43**, 103—219 (1975).
12. Tu A. T., Neurotoxins of animal venoms: snakes, Ann. Rev. Biochem., **42**, 235—258 (1973).
13. Low B. W., Preston H. S., Sato A., Rosen L. S., Searl J. E., Rudko A. D., Richardosn J. S., Three-dimensional structure of crabutoxin b neurotoxic protein: Inhibitor of acetylcholine receptor, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **73**, 2991—2994 (1976).
14. Tsernoglou D., Petsko G. A., The crystal structure of a postsynaptic neurotoxin from sea snake at 2.2 Å resolution, FEBS Lett., **68**, 1—4 (1976).
15. Walkinshaw M. D., Saenger W., Maelicke A., Three-dimensional structure of the 'long' neurotoxin from cobra venom, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **77**, 2400—2404 (1980).
16. Tseftin V. I., Pluzhnikov K., Karelin A., Ivanov V., Acetylcholine receptor interaction with neurotoxin II. photoactivable derivatives. In: Toxins as Tools in Neurochemistry. Hucho F., Ovchinnikov Y. A. (eds.), p. 159—169, De Gruyter, Berlin, New York (1983).
17. Winkler H., Westhead E., The molecular organisation of adrenal chromaffin granules, Neuroscience, **5**, 1803—1823 (1980).
18. Moore R. Y., Bloom F. E., Central catecholamine neuron systems: Anatomy and physiology of the norepinephrine and epinephrine systems, Ann. Rev. Neurosci., **2**, 113—168 (1979).
19. Moore R. Y., Bloom F. E., Central catecholamine neuron systems: Anatomy and physiology of the dopamine system, Ann. Rev. Neurosci., **1**, 129—169 (1978).
20. Kebabian J. W., Calne D. B., Multiple receptors for dopamin, Nature, **227**, 93—96 (1979).
21. Cawthon R. M., Breakefield X. O., Differences in A and B forms of monoamine oxidase revealed by limited proteolysis and peptide mapping, Nature, **281**, 692—694 (1979).
22. Lajtha A. (ed.): Handbook of Neurochemistry, 2nd edition, Vol. 3, Plenum Press, New York, London, 1983.
23. Siesjö B. K.: Brain Energy Metabolism, p. 168—172., J. Wiley and Sons, New York, Toronto, 1978.
24. Akil H., Watson S. J., Young E., Lewis M. E., Khachaturian H., Walker J. M., Endogenous opioids: Biology and function, Ann. Rev. Neurosci., **7**, 223—255 (1984).
25. Fredrickson R. C. A., Enkephalin pentapeptides: a review of current evidence for a physiological role in vertebrate neurotransmission, Life Sci., **21**, 23—41 (1977).
26. Kerr F. W. L., Wilson P. R., Pain, Ann. Rev. Neurosci., **1**, 83—102 (1978).
27. Whittaker V. P., The biochemistry of synaptic transmission, Naturwiss., **60**, 281—289 (1973).
28. Dowdall M. J., Fox G., Wächter K., Whittaker V. P., Zimmermann H., Recent studies on the comparative biochemistry of the cholinergic neuron, Cold Spring Harbor. Symp. Quant. Biol., **40**, 65—81 (1976).

29. Magazanik L. G., Functional properties of postjunctional membrane, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **16**, 161—175 (1976).
30. Iversen L. L., The chemistry of the brain, *Sci. Am.*, **241**, 118—129 (1979).
31. Cooper J. R., Bloom F. E., Roth R. H., *The Biochemical Basis of Neuropharmacology*, p. 140, 2nd edition, Oxford University Press, New York, London, Toronto, 1974.
32. Schmidt R. F., Thews G., *Einführung in die Physiologie des Menschen*, S. 121, 18. Auflage, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1976.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА

- Siegel G. J., Albers R. W., Agranoff B. W., Katzman R. (eds.): *Basic Neurochemistry*, 3rd edition, Little, Brown and Co., Boston, 1981.
- Klein R. L., Lagercrantz H., Zimmermann H. (eds.): *Neurotransmitter Vesicles*, Academic Press, London, New York, 1982.
- Cooper J. R., Bloom F. E., *The Biochemical Basis of Neuropharmacology*, 4th edition, Oxford University Press, New York, London, Toronto, 1982.
- Lajtha A. (ed.): *Handbook of Neurochemistry*, 2nd edition, Vol. 3: Metabolism in the Nervous System, Plenum Press, New York, London, 1983.
- Reichardt L. F., Kelly R. B., A molecular description of nerve terminal function, *Ann. Rev. Biochem.*, **52**, 871—926 (1983).
- Hucho F., Ovechinnikov Y. A. (eds.): *Toxins as Tools in Neurochemistry*, De Gruyter, Berlin, New York, 1983.
- Whittaker V. P., The synaptosome. In: *Handbook of Neurochemistry*, Lajtha A. (ed.), 2nd edition, Vol. 3, p. 1—41, Plenum Press, New York, 1984.

СИНАПС. ЧАСТЬ 2. РЕЦЕПТОРЫ

Рецепторы — физиологические центры действия

В настоящее время термин «рецептор» применяется в двух различных значениях. Во-первых, этим термином обозначают первичные приемники сенсорных стимулов — света, осязания, температуры и боли. В этом смысле рецептор представляет собой орган, состоящий из одной или более клеток; палочки и колбочки сетчатки являются, например, фоторецепторами. Во-вторых, термин «рецептор» описывает на молекулярном уровне связывающий центр для низкомолекулярного активного соединения. Такое определение опять-таки не вполне точно: многие исследователи считают рецептором любой центр, который специфично связывает лиганд независимо от его эндогенного или экзогенного происхождения. Нейрохимики же имеют в виду исключительно центры — мишени эндогенных эффекторов типа гормонов, простагландинов и нейромедиаторов. Согласно такому толкованию, термин «рецептор» не охватывает участки связывания нейротоксинов в аксональных ионных каналах или на ганглиозах нервной мембраны; он относится в основном к пре- и постсинаптическим рецепторам, которые всегда являются белками, связывающими пресинаптически высвобождающийся медиатор и тем самым обеспечивающими первую стадию химического возбуждения мембраны. Данное определение не исключает того факта, что такие рецепторы, как опиатный, обнаружены и охарактеризованы с помощью экзогенных лекарственных препаратов, и это особенно справедливо в тех случаях, когда эндогенный медиатор еще неизвестен.

Рецепторы нейромедиаторов исключительно важны для молекулярной нейробиологии, так как они играют ключевую роль при переносе нервных импульсов и являются центрами важных регуляторных процессов и тех изменений, которые происходят при некоторых нервных заболеваниях. Поскольку такие рецепторы представляют собой мишень действия многих нейрофармакологических препаратов, они представляют как практический, так и теоретический интерес. Поэтому биохимия рецепторных молекул — одно из наиболее активно развивающихся сейчас направлений нейрохимических исследований.

Три критерия, определяющие связывающий центр как рецептор

Идентификация рецептора основана на следующих предпосылках: необходимо иметь лиганд (эндогенный или экзогенный), в который можно ввести радиоактивную метку; этот лиганд должен иметь достаточно высокое сродство к рецептору, чтобы его можно было точно измерить при тесте связывания, и такое связывание должно быть специфичным для данного рецептора. Специфичность такого рода определяют также три критерия:

1) *насыщение* связывающего центра должно происходить при физиологически значимых концентрациях;

2) *локализация*, т. е. связывание должно происходить только в той ткани, в которой наблюдается биологическое действие;

3) *селективность*, которая означает, что этот лиганд должен быть единственным веществом, связывающимся с данным центром, или он должен эффективно конкурировать с другими эффекторами того же рецептора.

Только при строгом соблюдении всех этих условий можно исключить артефакты. Следующие два примера доказывают, что выполнения лишь одного критерия недостаточно: Куатреказас показал, что инсулин связывается с тальком с тем же сродством, что и с клеточной мембраной *in vivo*, а по данным Снайдера некоторые стеклянные фильтры связывают опиаты с такой же стереоспецифичностью, что и их биологический рецептор.

Три уровня исследования рецептора: данные должны коррелировать

Рецепторы исследуются на трех уровнях: в интактной ткани или в отдельных интактных клетках, в суспензиях мембран, полученных из этой ткани, и на молекулах, выделенных из нее. Считается, что биохимические исследования отражают физиологические свойства, если на всех уровнях получены согласующиеся результаты. Биохимические исследования рецепторных молекул увенчивались успехом только тогда, когда удавалось отделить эти молекулы от окружающих мембранных компонентов с сохранением присущих свойств. Наиболее полезными инструментами при таких исследованиях являются неионные детергенты, типа, например, тритона X-100, эмульфогена или бриджа. Они солибилизируют мембрану, но стабилизируют гидрофобный мембранный белок в воде и благодаря своим амфифильным свойствам заменяют липиды на белковой поверхности. Тем самым они предотвращают агрегацию и осаждение белка и позволяют избежать денатурации, которая всегда происходит при применении ионного детергента додецилсульфата натрия (ДСН) (гл. 3).

Следующие свойства рецептора особенно интересны для нейрехимиков: химический состав (т. е. состоит ли он из белка, углевода, глико- или липопротеина); молекулярная масса и четвертичная структура; аминокислотный состав и последовательность; углеводная последовательность; пространственная организация молекулярных компонентов; число лигандов и константы диссоциации лигандов со связывающими их участками; независимость или кооперативность связывающих участков; взаимодействие рецептора как со своим окружением (т. е. с мембранными липидами, с другими мембранными белками), так и с компонентами вне- и внутриклеточного пространства. Эти данные могут стать основой для попытки построения модели механизма функционирования рецептора.

Модели рецептора

До сих пор только один рецептор, никотиновый ацетилхолиновый рецептор, был тщательно очищен и биохимически охарактеризован. Но этого оказалось мало для создания общей теории связи между структурой рецептора и его функцией. Очевидно, что рецепторы имеют двойную функцию: они принимают и узнают специфические сигналы и одновременно иницируют первую стадию клеточного ответа на сигнал. Наряду с другими своими функциями рецепторы нейромедиатора регулируют ионную проницаемость постсинаптической мембраны (рис. 9.1). Связывание молекулы медиатора сопряжено, таким образом, с ответным открытием ионных каналов. Вопрос механизма функционирования рецепторов сводится по сути к представлению о механизме такого сопряжения.

Открытие ионных каналов — это, однако, не единственный ответ на связывание медиатора. В рецепторах катехоламина, например, первичный ответ состоит в продуцировании «вторичного мессенджера» cAMP, который с помощью протеинкиназы регулирует не только ионную проницаемость возбудимых мембран, но также энергию метаболизма и биосинтез белка в клетке. Рецепторы, определяемые как молекулы, связывающие эндогенные лиганды, являются в действительности компонентами мембранных комплексов, состоящих из молекул разных видов: одни из них связывают лиганды, а другие функционально активны в мембране. Способ, с помощью которого регулируется ионная проницаемость клеточной мембраны, можно рассмотреть на примере модели, разработанной для аксональных ионных каналов (гл. 6).

Рецептор является воротным механизмом, который может активироваться химически или — в аксоне — электрически путем изменения потенциала. Он образует одно целое с селективным

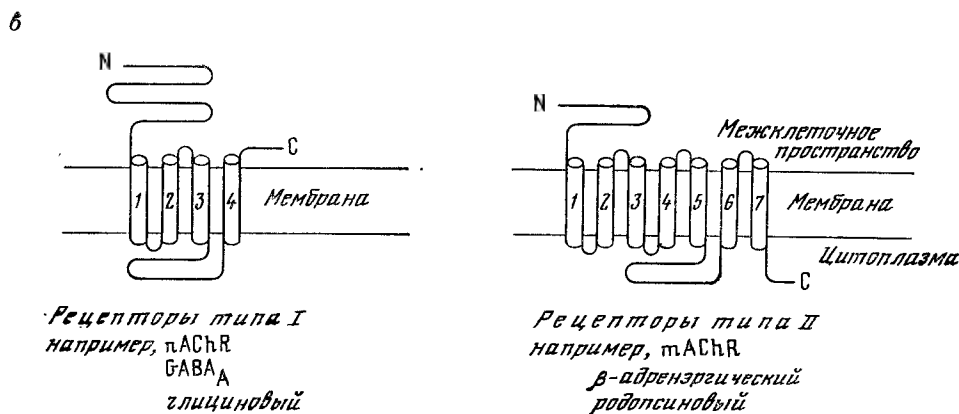
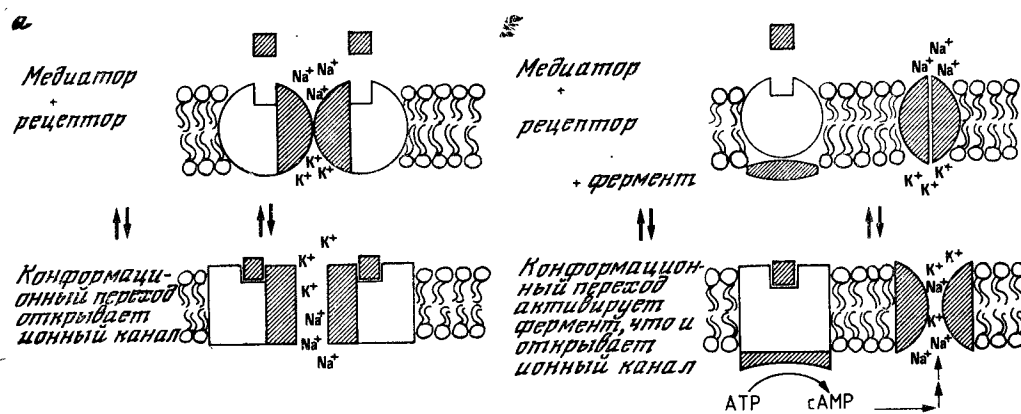
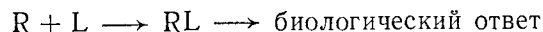


Рис. 9.1. Модели рецепторов. *а* — модели функционирования рецепторов; рецепторы типа I (слева) имеют собственные эффекторные системы (так, например, в ионном канале она является жестко сцепленным интегральным компонентом трансмембранного белка); рецепторы типа II (справа) могут связываться с эффектором временно или косвенно; они состоят из нескольких белков, которые можно разделить биохимически; *б* — предсказанные трансмембранные изгибы полипептидной цепи: рецепторы типа I имеют, вероятно, четыре трансмембранные последовательности, а рецепторы типа II — семь. Рецепторы типа II проявляют свою функциональную активность посредством G-белков (на этом рисунке опущены; см. рис. 9.14).

фильтром, от которого зависит прохождение через мембрану соответствующих ионов. Эта аналогия неприменима там, где рецептор проявляет свою активность в одной или более ферментативных стадиях. В таких случаях мы можем, однако, говорить о рецепторных комплексах, особенно когда в них входят регуляторные белки, как в случае β -адренэргического рецептора. В узком смысле слова термин «рецептор» часто используют как синоним понятия рецепторный комплекс, т. е. в предположении, что, кроме лигандсвязывающего центра, в нем имеются еще и молекулы эффектора. Однако вернемся к теории взаимодействия медиатора и рецептора.

Во многих случаях действие медиатора коррелирует с числом занятых им рецепторов [1]. Если такая «занятость» обратима, мы можем записать



где R — рецептор, L — лиганд, RL — комплекс рецептор-лиганд.

«Теория занятости» утверждает, что клеточный ответ зависит от концентрации занятых рецепторов [RL]. Здесь очевидно формальное сходство с теорией ферментативной кинетики Михаэлиса — Ментен, и суммарные кинетические уравнения также одинаковы. Полученные зависимости доза — ответ описываются гиперболой; а концентрация медиатора, необходимая для достижения половины максимального эффекта и обозначаемая EC_{50} , подобна константе Михаэлиса K_m в энзимологии, которая интерпретируется в простых случаях как константа диссоциации K_D комплексов белок — лиганд:

$$K_D = \frac{[R][L]}{[RL]}$$

Отношение биологического ответа Q при данной концентрации лиганда к максимально возможному ответу $Q_{\max}$ равно отношению концентрации занятых рецепторов [RL] к общей концентрации рецепторов $[R_{\text{общ}}]$:

$$\frac{Q}{Q_{\max}} = \frac{[RL]}{[R_{\text{общ}}]}$$

Отсюда

$$Q = \frac{Q_{\max}[L]}{K_D + [L]}$$

Так получается уравнение, аналогичное уравнению Михаэлиса — Ментен, в котором скорости реакции V и $V_{\max}$ заменены на биологические ответы Q и $Q_{\max}$, а концентрация субстрата — на концентрацию лиганда $[L]$.

Величина Q рассчитывается из измерений, например, потенциала деполяризации мембраны, содержащей рецептор. Зависимость обратных величин $1/Q$ от $1/[L]$ может быть использована для графического определения $Q_{\max}$ и K_D так же, как это делается в ферментативной кинетике по методу Лайнувера — Берка. Константа ингибирования антагониста K_i тоже может быть получена аналогичным путем как из упомянутого графика обратных величин, так и из графика Диксона — зависимости $1/Q$ от $[I]$, где $[I]$ — концентрация ингибитора (антагониста).

Зачастую зависимость доза — ответ описывается не гиперболой, а сигмоидальной кривой. В основе теории занятости лежит простой закон действующих масс. При сигмоидальной кривой он, очевидно, не приложим, и следует искать более сложные зависимости между связыванием лиганда и биологическим действием. Первоначально для объяснения была предложена теория «свободных» рецепторов, которые, как предполагалось, работают только при высокой концентрации лиганда. Однако более многообещающей кажется здесь опять аналогия с фермент-субстратным взаимодействием, на этот раз — с аллостерическими ферментами.

Исходя из такой интерпретации, рецептор нейромедиатора (или гормона) должен существовать по крайней мере в двух состояниях: неактивном или состоянии покоя (I) и в активном (A) состоянии (рис. 9.2). Равновесие между этими состояниями зависит от природы нейромедиатора (или гормона). Соединения, которые, подобно медиатору, благоприятствуют активному состоянию, называются агонистами, а те, которые смещают равновесие в сторону неактивного состояния, — антагонистами. Обсудим несколько моделей, используемых для количественного анализа результатов и установления взаимосвязи между концентрацией и ответом в случае медиаторов и других фармакологически активных соединений.

Модель I. Состояния I и A уже существуют до того, как лиганд начинает взаимодействовать с рецептором. Они находятся в «преформированном равновесии», при котором состояние I доминирует. Агонист связывается только с состоянием A; он стабилизирует активное состояние и активирует рецептор путем смещения равновесия от I к A. Антагонист преимущественно связывается с I и ингибирует смещение равновесия. Эта модель соответствует модели Моно — Уаймена — Шанже для аллостерических белков.

Модель II. В альтернативных моделях агонист уже может связываться и с I, а такое связывание приводит к переходу рецептора в активную конформацию A. Антагонисты могут либо связываться с тем же центром связывания, не иницируя активации в A (модель II), либо ингибировать связывание агониста

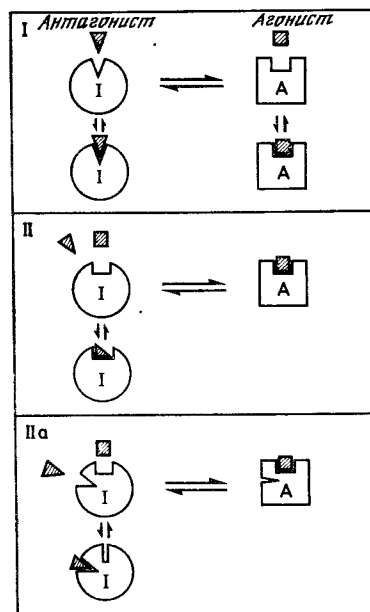


Рис. 9.2. Модель двух состояний медиаторного и гормонального рецепторов. I — неактивное состояние, A — активное состояние.

Первый механизм, по-видимому, лежит в основе действия многих местных анестетиков, тогда как второй относится к некоторым эффекторам адренэргических рецепторов (см. ниже).

Ионный канал может быть частью самого рецептора или отдельной молекулой, посредством которой передается информация, детектированная рецептором. Мы уже упоминали, что передача информации может происходить ферментативно или путем конформационных изменений и белок-белковых взаимодействий. Далее мы еще рассмотрим аллостерический механизм взаимодействия рецептора и ионного канала, предложенный Нахманзоном в 1955 г. [3] и позднее Белью, Карлин, Шанже и др. [2, 4, 5], в разделе, посвященном никотиновому ацетилхолиновому рецептору; ферментативный механизм показан на примере катехоламиновых рецепторов (рис. 9.1).

Изучение связывания: связывание не тождественно биологическому действию

Приведенные факты показывают, что кривая доза — эффект необязательно совпадает с кривой связывания. Возможно, на-

пример, что образование комплекса рецептор — лиганд подчиняется закону действующих масс и описывается гиперболой с насыщением субстрата, но для включения биологического эффекта необходимо занять два или более связывающих центра. Такого рода расхождения между кривыми связывания и зависимостями доза — эффект помогают понять механизм действия нейромедиаторов (или гормонов). Вот почему попытки охарактеризовать рецептор всегда начинают с изучения связывания.

Здесь могут быть использованы методы, известные из энзимологии и белковой химии: равновесный диализ, ультрацентрифугирование, гель-хроматография и ультрафильтрация. Основной проблемой является здесь выяснение различий между специфическим и неспецифическим связыванием, в особенности при изучении связывания, проводимом на препаратах мембран и на частично очищенных белковых фракциях. В центральной нервной системе концентрации рецептора могут составлять несколько пикомолей на 1 г ткани, а нейромедиаторы благодаря своим полярным свойствам легко взаимодействуют, хотя и слабо, с полярными мембранными компонентами, расположенными вне рецепторной области. Если даже такое неспецифическое связывание имеет сродство на несколько порядков ниже, чем специфическое связывание с рецептором (т. е. более высокую K_D), оно все же оказывается важным фактором, который следует принимать во внимание из-за большого числа присутствующих неспецифических связывающих центров. Таким образом, обнаружение рецептора в центральной нервной системе посредством изучения связывания возможно, если имеется лиганд с очень высоким сродством и с очень высокой удельной радиоактивностью ($>185 \cdot 10^{10}$ расп./с·ммоль).

Один из экспериментов по связыванию представлен на рис. 9.3. Кривая 1 дает общее количество связанного лиганда, как функцию его концентрации; она отражает как специфическое, так и неспецифическое связывание. Для доказательства этого факта получена кривая 2, показывающая связывание радиоактивного лиганда в присутствии 100-кратного избытка «холодного», т. е. немеченого лиганда. Последний вытесняет «горячий» лиганд из его специфически насыщаемого рецептора (с. 242, критерий 3); линейность кривой 2 свидетельствует о ненасыщаемом характере остаточного неспецифического связывания. Разность кривых 1 и 2 дает гиперболу 3, т. е. кривую насыщения, которая характеризует специфическое связывание лиганда и рецептора. Кривая 3 преобразована в график обратных величин (4), из которого и определяются K_D и максимальное связывание. Константы диссоциации и число центров связывания рассчитываются из диаграммы Скотчарда, в которой на оси координат откладывается отношение концентраций связанного

Таблица 9.1. Лиганды центров связывания нейромедиаторных рецепторов

Рецептор	Лиганд		Замещающий лиганд	K_D , нМ
	Агонист	Антагонист		
α -Адренэргический	$[^3H]$ -Норадреналин	$[^3H]$ -Клонидин	(—)-Норадреналин	26
		$[^3H]$ -WB 4101	(—)-Норадреналин	5
		$[^3H]$ -DHE	(—)-Норадреналин	0,6
			(—)-Норадреналин	1,6
β -Адренэргический	$[^3H]$ -HBI	$[^3H]$ -DHA	($\pm$)-Пропранолол	1,2
		$[^{125}I]$ -HYP	(—)-Альпренолол	1,3
			($\pm$)-Пропранолол	1,5
Допаминовый	$[^3H]$ -Апоморфин $[^3H]$ -ADTN		(+)-Бутакламо	1—2
			(+)-Бутакламо	6,0
		$[^3H]$ -Спироперидол	(+)-Бутакламо	0,3
		$[^3H]$ - α -Флупентиксол	(+)-Бутакламо	3,8
Серотониновый	$[^3H]$ -Серотонин	$[^3H]$ -LSD	Серотонин	8-15
			Серотонин	5-8
Гистаминовый	$[^3H]$ -Гистамин		Гистамин	9,4
Гистаминовый H_1		$[^3H]$ -Мепирамин	Прометазин/трипролидин	1,7
Гистаминный H_2		$[^3H]$ -Циметидин	Циметидин/гистамин	42
GABA-рецептор	$[^3H]$ -GABA		GABA	16,0
	$[^3H]$ -Мусцимол		GABA	4—5
		$[^3H]$ -Бикукуллин	GABA	380,0
Глутаматный		$[^3H]$ -Каиновая кислота	Глутамат	12,0
Глицериновый		$[^3H]$ -Стрихнин	Стрихнин/глицин	
Мускариновый холинергический	$[^3H]$ -Оксотреморин-М		Атропин	2,9
		$[^3H]$ -QNB	Атропин/оксотреморин	0,06
		$[^3H]$ -Дексетимид	Дексетимид	0,65
Никотиновый холинергический		$[^{125}I]$ - α -Бунгаротоксин	Никотин	0,11
Опиатный		$[^3H]$ -Налоксон	Леваллорфан	1—4
	$[^3H]$ -Leu-Энкефалин		Leu-Энкефалин	0,4
Бензодиазепиновый	$[^3H]$ -Диазепам		Диазепам/клоназепам	
	$[^3H]$ -Флунитразепам		Хлордiazепоксид	4—6
Ангиотензиновый II	$[^{125}I]$ -Ангиотензин II		Ангиотензин	0,23
Рецептор TRH	$[^3H]$ -TRH		TRH	50
Нейротензиновый	$[^3H]$ -Нейротензин		Нейротензин	1—2
Бомбезиновый	$[^{125}I]$ -Tyr ⁴ -Бомбезин		Tyr ⁴ -Бомбезин	3,0
Рецептор VIP	$[^{125}I]$ -VIP		VIP	36,0

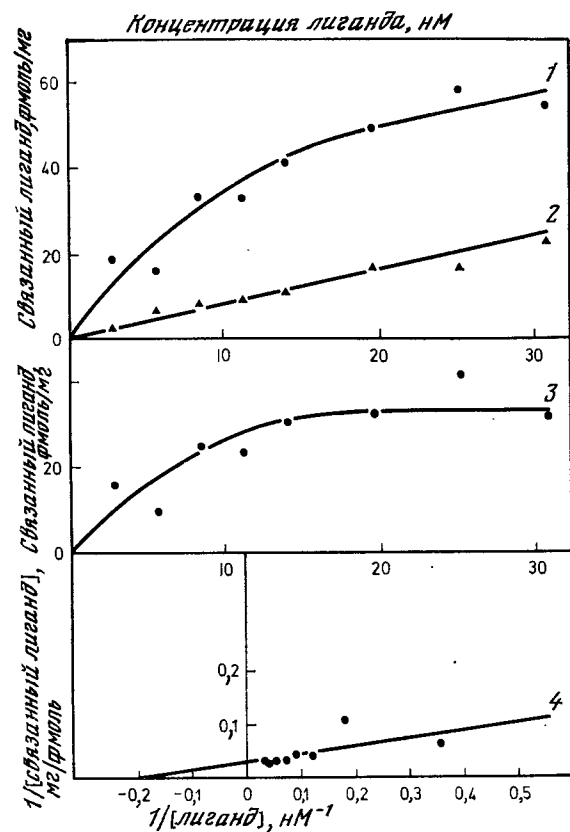


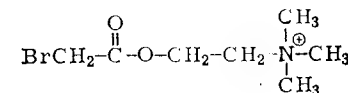
Рис. 9.3. Связывание лиганда с препаратом рецептора: 1 — связывание как функция радиоактивно меченного лиганда; 2 — связывание того же лиганда в присутствии 100-кратного избытка нерадиоактивного лиганда; эта невытесняемая часть радиоактивного лиганда связывается неспецифически; 3 — разность между кривыми 1 и 2 — это насыщаемое, т. е. специфическое связывание; 4 — график обратных величин, построенный по данным кривой 3; экстраполяция до пересечения с осью абсцисс дает K_D , а пересечение с осью ординат — максимальное связывание.

и свободного лигандов, а на оси абсцисс — концентрация связанного лиганда. В табл. 9.1 представлены некоторые радиоактивные лиганды и соединения, которые часто используются в последнее время в экспериментах по вытеснению (кривая 2 на рис. 9.3), проводимых на целом ряде нейромедиаторных рецепторов центральной нервной системы.

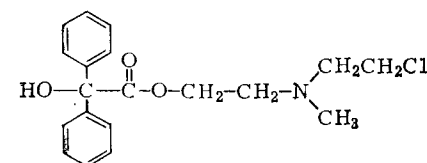
Методологические замечания: необратимое связывание, аффинное мечение

Данные по связыванию в тканях, клетках или даже на мембранных препаратах часто не воспроизводятся в опытах с рецепторами в растворах или с очищенными рецепторами. Иногда способность к связыванию рецептора полностью исчезает, если его извлекают из мембранного окружения. В таких случаях для исследования рецептора можно использовать метод аффинного мечения: подбирается лиганд, который имеет структуру, обеспечивающую его специфическое связывание, содержит подхо-

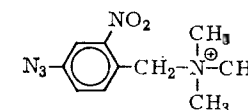
БРОМОАЦЕТИЛХОЛИН
алкилирующее производное
никотинового холинэргического агониста



БЕНЗИЛИЛХОЛИН-МУСТАРД
(метилхлорэтиламино-этиловый эфир бензиловой кислоты)
необратимый алкилирующий антагонист мускаринового ацетилхолинового рецептора



4-АЗИДО-2-НИТРОБЕНЗИЛТРИМЕТИЛАММОНИЙ
фотоаффинный реагент, никотиновый холинэргический антагонист



ПРОИЗВОДНОЕ ПРОПРАНОЛОЛА
необратимый β -адренэргический антагонист

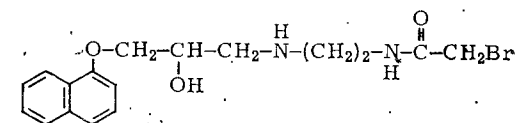
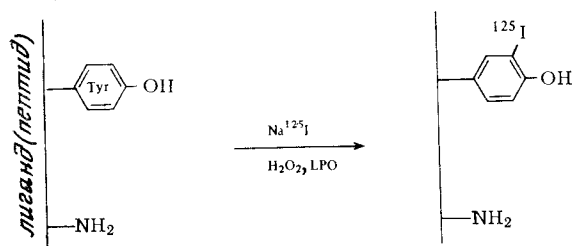


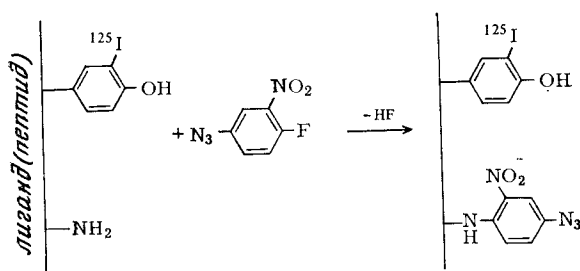
Рис. 9.4. Некоторые типичные необратимые рецепторные лиганды.

дующую метку (радиоактивный атом, сильно флуоресцирующий или светопоглощающий заместитель) и реакционную группу, позволяющую связать его ковалентно с рецептором. Затем рецептор связывается с этим аффинным реагентом, метится им *in situ* и идентифицируется после солюбилизации мембраны путем измерения приобретенной радиоактивности, флуоресценции или поглощения света. Некоторые типичные нейробиохимические аффинные реагенты показаны на рис. 9.4. Часто они реагируют спонтанно, особенно когда реакционная группа придает им свойства алкилирующего агента, но наибольшую ценность имеют реагенты, которые активируются при освещении (так называемые фотоаффинные реагенты), так как в этом случае интен-

I. Радиоактивное мечение тирозинового остатка



II. Введение фторреактивной нитрофенилазидной группы (NAP)



III. Необратимая сшивка пептида и рецептора

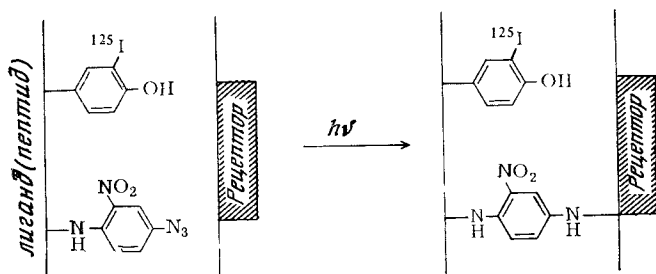


Рис. 9.5. Фотоаффинное мечение рецептора специфическим лигандом — метод, использованный для идентификации рецепторов инсулина, ацетилхолина и других соединений (LPO — лактопероксидаза).

сивность освещения и продолжительность реакции можно контролировать. На рис. 9.5 в качестве примера приведен метод, с помощью которого пептидный гормон, нейромедиатор или токсин ковалентно связывают с рецептором: пептид обрабатывают 4-фторо-3-нитрофенилазидом, затем инкубируют в темноте с тканью, содержащей рецептор, и активируют освещением. Этот метод, разработанный для инсулинового рецептора, был успешно использован для обнаружения нейротоксинсвязывающих центров в аксональной и постсинаптической мембранах.

В некоторых случаях фотоаффинное мечение не требует получения азидных производных лиганда, которые иногда трудно синтезировать и которые в фармакологическом отношении отличаются от природного лиганда. Просто УФ-облучение комплексов рецептор — лиганд может приводить к ковалентному включению метки. Например, глициновый рецептор удалось пометить таким способом [³H]стрихнином, бенздиазепиновый рецептор — [³H]флуонитразепамом, а никотиновый ацетилхолиновый рецептор — целым рядом радиоактивных неконкурентных антагонистов.

Мобильные рецепторы: гипотеза «плавающего рецептора»

Имеются примеры ионных регуляторных комплексов, в которых рецептор и ионный канал, по-видимому, находятся в разных молекулах. Так, некоторые ацетилхолиновые рецепторы, найденные в нейронах *Aplysia*, после связывания с ацетилхолином увеличивают натриевую проводимость. Другие ацетилхолиновые рецепторы того же организма вызывают быстрое возрастание проводимости ионов хлора, тогда как третьи — медленное возрастание калиевой проницаемости [6]. Если принять, что связывающий компонент этих рецепторов один и тот же, что никак не доказано, то он должен действовать в комбинации то с калиевыми, то с натриевыми, то с хлорными каналами [7]. Хотя такие комбинации и казались постоянными, следующие наблюдения привели к выдвижению гипотезы «плавающего», или «мобильного», рецептора. Согласно этой гипотезе рецепторы не связываются в постоянные комплексы, а «плавают» в мембране и взаимодействуют с различными активными структурами: транспортными системами, ферментами и т. д. (рис. 9.6). Имеется, например, только один тип рецептора для инсулина, который, однако, отдельно регулирует целый ряд мембранных функций: транспорт глюкозы, аденилатциклазную, фосфодиэстеразную, Na^+ , K^+ -АТФазную, Ca^{2+} -АТФазную активности, а также транспорт аминокислот. Напротив, в жировых клетках крыс имеются, по крайней мере, восемь различных рецепторов, и все они регулируют аденилатциклазную активность. Связывание

восьми эффекторов неконкурентно и действие их неаддитивно. Этот факт можно объяснить, только если предположить, что различные лиганд-рецепторные комплексы конкурируют за одну циклазу. Гипотеза мобильного рецептора подтверждена экспериментами на клеточных культурах. Мутанты, лишенные тех или иных рецепторов или ферментов, получали из клеток с β -адренэргическим и простагландиновым рецепторами, которые

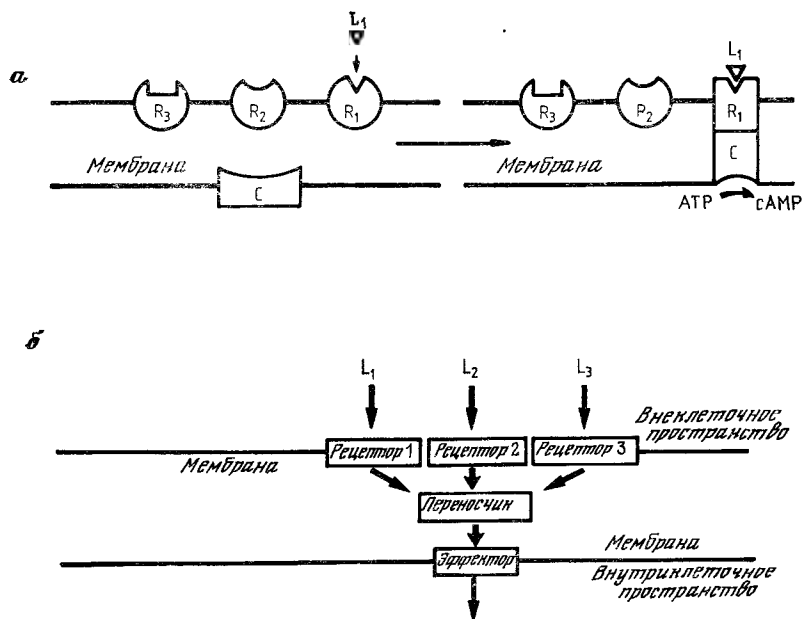


Рис. 9.6. Схема, поясняющая гипотезу плавающего рецептора. а — из различных рецепторов R_1 , R_2 , R_3 , находящихся в мембране, только один, активированный своим лигандом L_1 (агонистом или гормоном), взаимодействует с аденилатциклазой C и активирует ее; третий плавающий компонент — G -белки (сопрягающие белки) — здесь для простоты не показан (см. рис. 9.14). б — этим способом сигналы нескольких лигандов L_1 , L_2 , L_3 могут передаваться от различных рецепторов к единственной циклазе. G -белки функционируют как переносчики сигналов от R к C . Трехкомпонентный комплекс рецептор — переносчик — аденилатциклаза, постулированный Левицим в гипотезе «столкновение — сопряжение», в процессе передачи сигнала через мембрану не образуется.

независимо друг от друга регулировали активность аденилатциклазы. Эти результаты показали, что рецептор и циклаза кодируются разными генами (см. ниже). Аналогичные результаты были получены на рецепторах хемотаксиса бактерий (гл. 11). Видимо, еще на ранних стадиях эволюции сформировался принцип экономного построения мембранных функций на основе функциональных строительных блоков.

Наряду с мобильными рецепторами существуют и другие, более стабильные комплексы, выполняющие транспортные функции. Одним из примеров является никотиновый ацетилхолиновый рецептор позвоночных (см. ниже). Это первый рецептор, который мы обсуждаем детально, так как он биохимически охарактеризован лучше других.

Ацетилхолиновые рецепторы

Электрофизиологически и фармакологически различают два типа холинэргических синапсов: никотиновый и мускариновый (см. с. 193). Соответственно имеются два типа ацетилхолиновых рецепторов, из которых до сих пор только никотиновый достаточно полно охарактеризован биохимически. Этому способствовали два фактора: открытие α -токсина из яда змей (α -бунгаротоксина, α -токсина из *Naja naja* — полипептидов с M 7800; см. гл. 8), которые обнаруживают высокое сродство и специфичность связывания с никотиновыми рецепторами, и наличие богатого источника этого рецептора в электрических органах *Electrophorus*. Токсины змей использовались как инструменты для определения этого рецептора *in vivo* и *in vitro* и для его очистки методом аффинной хроматографии. Никотиновый ацетилхолиновый рецептор рассмотрен детально, потому что, по-видимому, почти ни в одной другой области нейрофизиологии и молекулярной биологии не взаимодействовали так плодотворно, и, во-вторых, потому, что развитые здесь методы исследования послужили моделью для изучения других рецепторов.

Никотиновый ацетилхолиновый рецептор. Первый уровень: интактные клетки

Рецептор электрических тканей был исследован на трех уровнях [5] (рис. 9.7). Шоффениелс и Нахманзон показали, что интактные электрические клетки, называемые пластинками электрического органа, можно выделить из электрического органа *Electrophorus* и исследовать электрофизиологическими методами. Для изучения клеток *Torpedo* такие методы менее удобны, так как его клетки тоньше, но и на них основные свойства ацетилхолинового рецептора в интактной ткани были исследованы. Было показано, например, что различные агонисты могут вызывать деполяризацию клетки и что зависимость доза — ответ (деполяризации от концентрации агониста) имеет сигмоидальный характер. Нахманзон предположил, что существует аналогия между взаимодействиями рецептор — медиатор и фермент — субстрат [3]. Продолжая эту аналогию, сигмоидальный характер

зависимости доза — ответ можно интерпретировать как кооперативное явление. Сегодня мы знаем, что кооперативными процессами являются как связывание агониста с рецептором, так и последующая стадия открывания ионного канала.

Второй уровень: рецепторная мембрана

На втором уровне исследования этого рецептора гомогенат постсинаптической мембраны был разделен на фрагменты путем

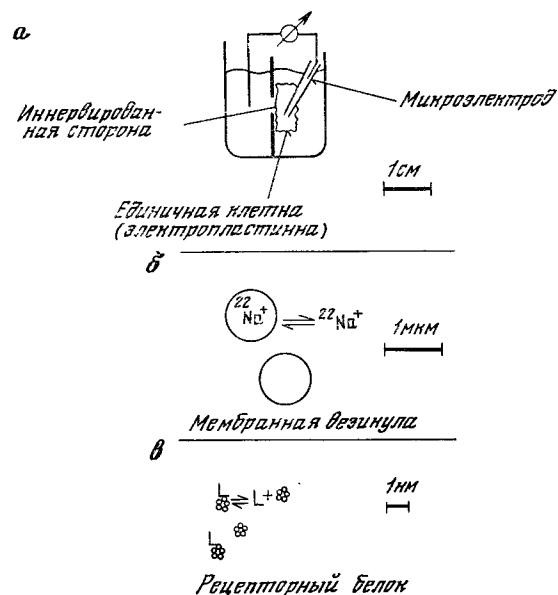


Рис. 9.7. Три уровня исследования рецептора. В качестве примера был выбран никотиновый ацетилхолиновый рецептор из электрoplastинки электрического угря. а — электрофизиологическое изучение интактной клетки препарата, предложенного Нахманзоном и ШOFFениелсом; б — исследование функций рецептора (связывания лиганда и выход меченого натрия по методу Касай и Шанже) с использованием везикулярных фрагментов постсинаптической мембраны; в — изучение связывания лиганда L с очищенным рецепторным белком.

центрифугирования в градиенте плотности. Эти фрагменты содержали высокоочищенный рецептор в естественном окружении его собственных лигандов, но без цитоплазмы и обычных клеточных компонентов (рис. 9.8). Как отмечалось выше, изучение связывания показало, что связывание ацетилхолина с мембранно-связанным рецептором кооперативно. Коэффициент Хилла здесь, как и *in vivo*, составляет 1,7. Однако константы диссоциации на два порядка ниже ($1,8 \cdot 10^{-8}$), чем K_D , вычисленная

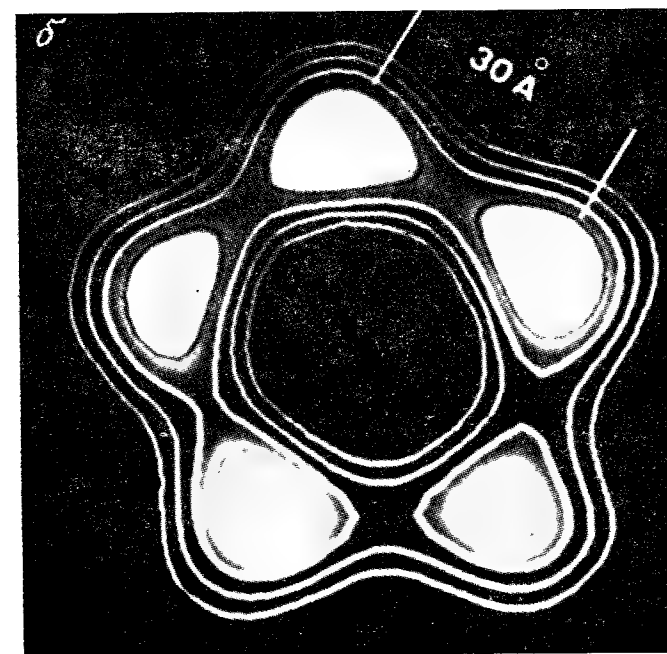
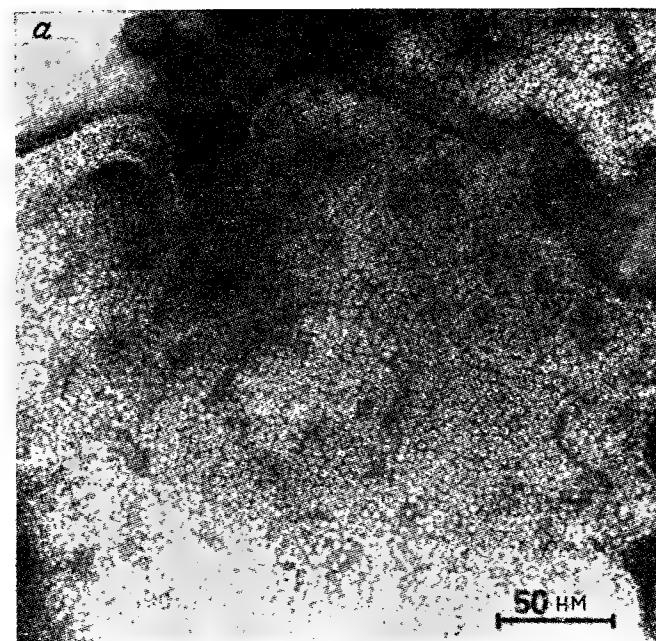
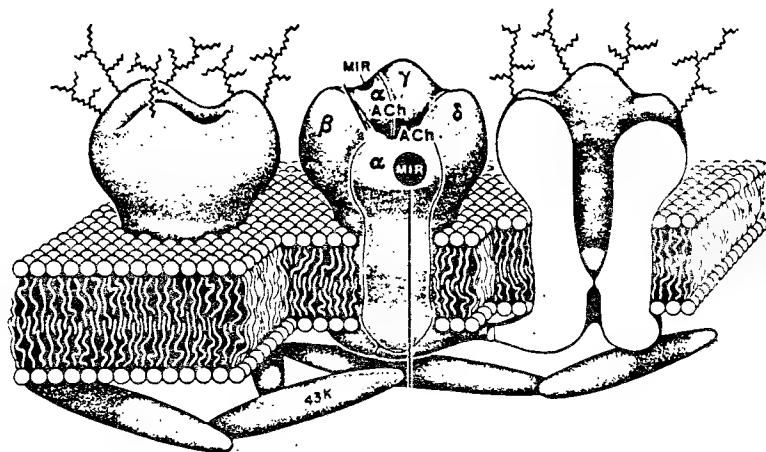


Рис. 9.8 (см. с. 260—261).

6



2

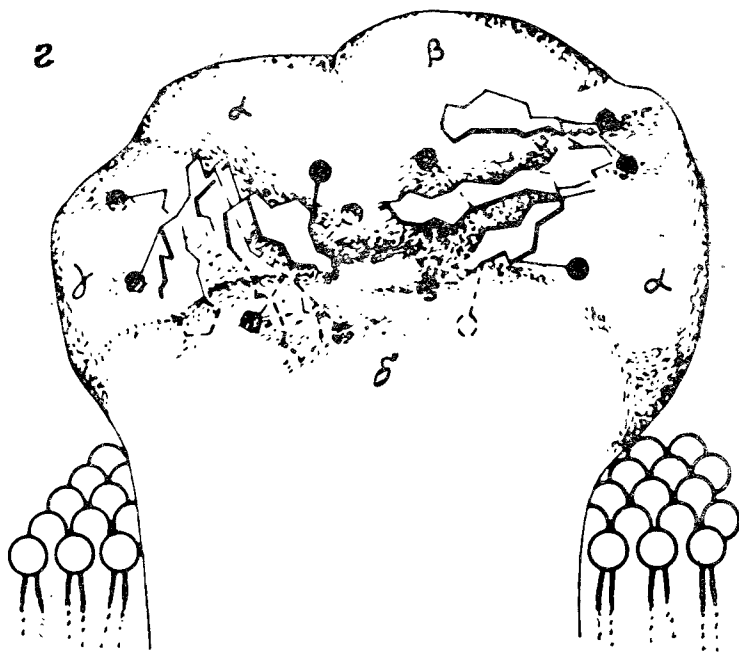


Рис. 9.8. Рецептор нейромедиатора в мембране. а — электронная микрофотография постсинаптической мембраны никотинового холинэргического синапса, выделенного из электрической ткани *Torpedo*. Напоминающие бублик структуры — это рецепторы (электронная микрофотография предоставлена М. Гир-

из концентрационной кривой. Мы еще вернемся к этому при обсуждении механизма фармакологической десенситилизации.

Фрагменты постсинаптической мембраны проявляют одно важное свойство, использование которого помогает перебросить мост понимания между физиологией интактного организма и его биохимией. Они легко образуют замкнутые везикулы (не путать с синаптическими везикулами, содержащими пресинаптический медиатор), которые сохраняют основные биологические свойства мембраны: так, например, поток ионов через мембрану активируется ацетилхолином и другими агонистами и ингибируется α -нейротоксинами и другими антагонистами. В эти везикулы вводили $^{22}\text{Na}^+$, суспензию разбавляли физиологическим буфером, взятую через известные промежутки времени аликвоту отфильтровывали с тем, чтобы измерить количественно выход радиоактивности (рис. 9.9). Если растворяющий буфер содержал агонист, выход $^{22}\text{Na}^+$ увеличивался. Зависимость доза — ответ, построенная по полученным данным, была очень близка кривой, полученной при измерениях *in vivo*.

Богатые рецепторами мембранные везикулы служат прекрасными модельными системами; они содержат очень мало посторонних белков, и с их помощью можно тестировать и связывание медиатора, и регуляцию ионной проницаемости. Изучение такой регуляции невозможно на очищенном рецепторе, так как он лишен своего липидного окружения. Следует также иметь в виду количественные различия между потоком ионов *in vivo* и их потоком через мембрану таких везикул. Как и все

зигом; лаборатория автора); б — компьютерная обработка этого изображения дает более детальную картину рецептора (данные автора и В. Куната из Института Фрица Хабера, Берлин); в — модель, суммирующая имеющиеся биохимические данные. Никотиновый ацетилхолиновый рецептор изображен в виде пентамера из пяти гликопротеинов, пронизывающих мембрану. MIR — это основной иммуногенный участок, расположенный на α -полипептидных цепях, против которого вырабатывается особенно большое количество моноклональных антител. 43К — белок с M 43 000, ассоциированный с рецептором на внутренней стороне мембраны. Зигзагообразные линии, исходящие от верхней внеклеточной части рецептора, изображают олигосахаридные цепи. (Воспроизводится с разрешения.) [Lindstrom et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1983, v. 48, p. 89—99]; г — схема расположения двух молекул α -нейротоксина на рецепторе *Torpedo* по данным связывания спинмеченых, флуоресцентно-меченых и фотоактивируемых производных нейротоксина II из *Naja naja oxiana* (кружочками обозначены соответствующие метки). (Воспроизводится с разрешения В. И. Цеглина.) [Tsetlin V., Peptides. Structure and Function, Proceedings of the Ninth American Peptide Symposium, C. M. Deber, V. J. Hruby, K. D. Kopple (eds.), 1985, Pierce Chemical Company, Rockford, p. 833—842.]

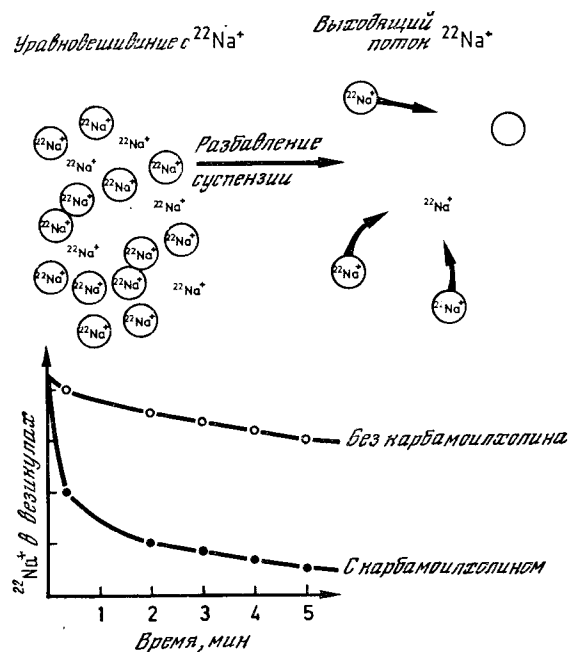


Рис. 9.9. Измерение ионной проницаемости биологической мембраны *in vivo*. Теория метода заключается в том, что постсинаптическая мембрана образует замкнутые везикулы при приготовлении этих препаратов. В эти везикулы могут быть введены радиоактивные ионы, затем путем разбавления может быть создан концентрационный градиент и путем измерения радиоактивности определен выходящий поток ионов после фильтрации образцов суспензии через различные интервалы времени. Выход ионов стимулируется агонистами (здесь карбамилхолином).

модельные системы, данная модель лишь отчасти отражает происходящие в мембране процессы и при детальном рассмотрении несовершенна.

Третий уровень: молекулы рецептора

Белок ацетилхолинового рецептора может быть выделен в количествах ~ 10 мг из электрической ткани *Torpedo*, особенно богатой рецептором [5, 8]. Он состоит из гликопротеина с M 270 000. Рецептор представляет собой белковый комплекс, состоящий из пяти полипептидных цепей, имеющих стехиометрию $\alpha_2\beta\gamma\delta$ (см. также с. 203). С помощью аффинных реагентов было показано, что связывающие центры для низкомолекулярных эффекторов располагаются на пептидах с M 40 000, т. е. на α -субъединицах. В изолированном виде эти полипептиды,

а также некоторые их фрагменты способны связывать α -нейротоксины, однако в нативном рецепторном комплексе эти нейротоксины взаимодействуют с обширной областью, включающей участки всех субъединиц (рис. 9.8, г). О функциональной роли этих более высокомолекулярных полипептидов в настоящее время известно мало. Возможно, они принимают непосредственное участие в ионном транспорте через мембрану и в регуляции ответа на действие агонистов.

Полипептидные цепи с M 40 000 содержат дисульфидную связь. Если ее расщепить восстановлением, то кооперативность связывания лиганда исчезает и коэффициент Хилла становится равным 1,0; в то же время уменьшается и сродство к ацетилхолину. Этот эффект обратим; окисление с помощью 5,5'-дитиобис(2-нитробензоата) возвращает систему в исходное состояние.

Ацетилхолиновый рецептор регулирует ионную проницаемость постсинаптической мембраны, вероятно, посредством конформационного изменения рецепторного белка. Данные о конформационных изменениях после связывания лиганда были получены путем измерения внутренней (триптофан) и внешней флуоресценции (в последнем случае может быть использован в качестве флуоресцентной «репортерной» группы местный анестетик хинакрин; см. рис. 8.11).

Фармакологическая десенсibilизация: модель модуляции синапса

Если постсинаптическая мембрана подвергается действию увеличенных концентраций ацетилхолина (и если одновременно блокируется ацетилхолинэстераза), то наблюдается медленное снижение постсинаптического ответа. По-видимому, мембрана становится менее чувствительной к агонистам. Это явление, называемое десенсibilизацией, наблюдается на всех трех уровнях организации: в интактной ткани, в мембранных везикулах и в изолированном рецепторе. Ионный поток через мембрану ингибируется, но не потому, что рецепторы связывают агонисты слабее, а потому, что ионные каналы не открываются. Фармакологическая десенсibilизация наблюдается не только для ацетилхолинового рецептора, но и для многих других систем, например для рецепторов пептидных гормонов и β -адренэргических рецепторов.

Пока неизвестно, несет ли десенсibilизация ацетилхолиновых рецепторов какую-либо физиологическую функцию, однако полагают, что она представляет собой еще один способ регулирования синаптической передачи. Было показано, что сродство агонистов к ацетилхолиновому рецептору может увеличиться

даже на два порядка, если они находятся в контакте с рецептором достаточно долгое время; увеличение происходит за период времени от нескольких секунд до минут и сопровождается конформационными изменениями белка. Такие конформационные изменения можно проследить с помощью кинетических измерений, путем измерения внешней или внутренней флуоресценции или по уменьшению реакционной способности SH-групп белка. Десенсибилизация ускоряется ионами кальция и местными анестетиками. Антагонисты не вызывают десенсибилизации. Все эти наблюдения позволили заключить, что ацетилхолиновый рецептор существует по крайней мере в трех состоя-



ниях: неактивном I (канал закрыт, низкое сродство), активном A (канал открыт) и десенсибилизированном D (канал закрыт, высокое сродство). Связываясь с A, агонист активирует рецептор и открывает его ионный канал, тогда как антагонист связывается с I, стабилизируя рецептор в его неактивном состоянии с закрытым каналом. (Описание альтернативного механизма «индуцированного соответствия» см. на с. 247.)

Ацетилхолиновые рецепторы из мышечной ткани

Поскольку в электропластинках *Torpedo* на долю ацетилхолинового рецептора приходится ~2% мембранного белка, достаточно всего 50-кратной степени очистки для получения этого рецепторного белка в чистом виде. Напротив, для выделения ацетилхолинового рецептора из мышц необходима >10 000-кратная степень очистки. Но даже и это достигается только с применением специального приема — использования денервированной мышцы, а денервация сама по себе приводит к 20-кратному увеличению концентрации рецептора (см. ниже).

Мышечные рецепторы дают перекрестную реакцию с антителами к рецептору *Torpedo*. Это указывает на их химическое сходство. Последние работы по определению первичных структур (с помощью КДНК) выявили значительную гомологию последовательностей.

Гиперсенсibilизация. Еще одна модель модуляции рецептора?

Если перерезать двигательный нерв, то вся поверхность мышечного волокна в течение нескольких дней приобретает способность активироваться ацетилхолином (гиперсенсibilизация) [8]. Ацетилхолиновые рецепторы перестают находиться только

в своей специфической области, субсинаптической мемbrane, а распределяются равномерно по всему волокну. Увеличение внесинаптической плотности рецепторов обусловлено не диффузией имеющихся синаптических рецепторов, а синтезом новых рецепторов. Некоторые ингибиторы биосинтеза белка ингибируют гиперсенсibilизацию или чувствительность внесинаптической мембраны к агонистам. Если к препарату в момент денервации прибавить [³⁵S]метионин, то он включится в новые рецепторы.

Пока нет ясности, идентичны ли химически вновь синтезированные внесинаптические рецепторы субсинаптическим. Некоторые данные свидетельствуют против этого. Так, изоэлектрическая точка внесинаптического рецептора равна 5,3, т. е. на 0,15 ед. pH (или 5 ионных зарядов) выше, чем у субсинаптического (или у рецептора, выделенного из иннервированной мышцы). Кинетические данные для соответствующих ионных каналов также отличаются: после активации агонистами каналы денервированных мышц остаются открытыми в ~3 раза дольше, чем каналы иннервированных мышц. Однако они обладают только 1/3 проводимости последних. В то же время их сродство к лигандам и иммунологические свойства практически одинаковы. Ионная специфичность рецепторного канала не меняется (ионы кальция и натрия проникают, а хлорид-ионы — нет). Кураре и α-бунгаротоксин ингибируют активацию. Возможно, оба типа рецепторов кодируются одними генами, но при переходе в мембрану по-разному модифицируются посттрансляционно. Как раз этот аспект и делает денервацию и связанную с ней гиперсенсibilизацию такими интересными. Возникают следующие вопросы. Как регулируется распределение рецепторов на поверхности клетки [7]? Что приводит к исчезновению внесинаптического рецептора при онтогенезе и к субсинаптической агрегации? Полагают, что это связано с молекулярным механизмом синаптического сопряжения между клетками в период эмбрионального развития и является моделью регуляции процессов обучаемости и поведения. Мы вернемся к этой проблеме в гл. 11.

Следующим важным фактором является то, что гиперсенсibilизация может быть обращена путем реиннервации. Однако этого не происходит, как можно было подумать, под действием трофического фактора из нерва: прямая электрическая стимуляция мышечного волокна вызывает исчезновение внесинаптических рецепторов таким же образом, как и стимуляция нерва. Напротив, денервацию необязательно вызывать только перерезанием нерва, для этого достаточно блокировать синаптическую передачу ботулиническим токсином (пресинаптическое действие) или α-бунгаротоксином (постсинаптическое действие).

Картина стимуляции, или частота импульсов, — это, очевидно, жизненно важный фактор для распределения рецепторов на поверхности клетки, и этот же фактор влияет также на экспрессию генов, и затем клеточную дифференциацию путем индукции биосинтеза белка. Таким образом, набор ферментов быстрого мышечного волокна может быть создан в медленном волокне, если соответствующую картину стимуляции применять к нему достаточно долго [9]. Возможно, индуктором этого процесса является Ca^{2+} , но это всего лишь предположение. В любом случае уменьшение количества рецепторов на определенной области поверхности мембраны при специфической картине стимуляции можно понять как характерное для дифференциации и, таким образом, считать, что оно имеет хромосомное происхождение. Все еще ведутся споры о теории, утверждающей, что стабилизация синаптических рецепторов происходит посредством ковалентной посттрансляционной модификации и что именно этот процесс делает их в противоположность внесинаптическим рецепторам устойчивыми к протеолитической деградации.

Фосфорилирование ацетилхолиновых рецепторов

Такой ковалентной модификацией могло бы быть фосфорилирование рецептора в присутствии АТР, как это наблюдалось в *Torpedo* [10] и *Electrophorus* [5]. Постсинаптическая мембрана содержит сАМР-зависимую киназу и фосфатазу. Карбамоилхолин предотвращает фосфорилирование рецептора. Однако функциональное различие между двумя взаимопревращающимися формами рецептора, фосфорилированной и дефосфорилированной, до сих пор не выяснена.

Миастения — аутоиммунное заболевание никотинового холинэргического синапса

Миастения — это заболевание, для которого характерны слабость и патологическая утомляемость мышц. Его причиной является нарушение синаптической передачи на нейромышечной концевой пластинке. Симптомы заболевания обычно состоят в прогрессирующей мышечной утомляемости, опускании век, медленном жевании, а при тяжелых случаях — в быстром истощении при мышечном движении или работе. Частота встречаемости заболевания составляет ~3 человека на тысячу, причем у женщин оно встречается чаще, чем у мужчин, и характерно для 40-летней возрастной группы. Имеются данные о наследственном характере заболевания, но пока это не доказано. Заболевание может иметь летальный исход. Однако новые методы лечения могут продлить жизнь более чем на 15 лет.

На локализацию в синапсе нарушений, вызывающих это заболевание, указывает, то, что ингибиторы ацетилхолинэстеразы (неостигмин или эдрофоний) приводят к ослаблению симптомов, в то время как наблюдается исключительная чувствительность к кураре. Наблюдаются заметные морфологические изменения в структуре концевой пластинки. Расстояние между пре- и постсинаптической мембранами значительно больше, постсинаптическая мембрана имеет меньше складок, а субсинаптическая поверхность кажется уменьшенной. Пресинаптические изменения проявляются на развитых стадиях заболевания. Синтез, упаковка медиатора в синаптические везикулы и его пресинаптическое высвобождение не затрагиваются.

За последние годы достигнут большой прогресс в изучении этого заболевания на молекулярном уровне. Теперь известно, что постсинаптическая мембрана слабее отвечает на действие агонистов, так как число ацетилхолиновых рецепторов в ней уменьшено более чем на 70%. Свойства оставшихся рецепторов и, в частности, время открывания и проводимость отдельных ионных каналов остаются неизменными.

Заболевание *Myasthenia gravis* относится к аутоиммунным. Прежде уже отмечалось, что поражение иммунной системы при миастении часто сопровождается появлением опухолей или увеличением тимуса. Хирургическое удаление тимуса во многих случаях ослабляет симптомы. Более определенным доказательством аутоиммунной природы заболевания явилось обнаружение в сыворотке больных антител против ацетилхолинового рецептора; их детекция была осуществлена с помощью чувствительного радиоиммунного анализа (РИА или RIA), основанного на блокировании антителами связывания с рецептором [^{125}I]- α -бунгаротоксина. Аутоиммунная гипотеза была подтверждена наблюдением Патрика и Линдстрёма, что инъекция очищенного ацетилхолинового рецептора из электрических рыб (*Torpedo* или *Electrophorus*) кроликам приводила к появлению типичных симптомов миастении. Так была найдена экспериментальная модель этого заболевания, которая сделала возможным понимание его механизма и развитие улучшенных способов лечения. В настоящее время роль, которую играют антитела, точно неизвестна. Эксперименты *in vivo* показали, что антитела не блокируют синаптическую передачу прямо на нейромышечной концевой пластинке. Очевидно, нет и прямой конкуренции между медиатором и антисывороткой за рецептор; а *in vivo*, кроме того, действие вводимого рецептора проявляется через большой промежуток времени намного позже образования антител. Сейчас многие научные коллективы заняты изучением этого заболевания, и, возможно, вскоре появится дополнительная информация о молекулярном механизме действия антител против рецептора

и о том, что вызывает симптомы миастении. Например, было найдено, что при действии антител ускоряется протеолитическая деградация рецептора. Возможно, что именно таким способом антитела уменьшают плотность рецептора на концевой пластинке и увеличивают тем самым скорость его обмена.

Мускариновый ацетилхолиновый рецептор

Ацетилхолиновые рецепторы поперечно-полосатых скелетных мышц являются никотиновыми, а рецепторы гладких мышц, например кишечника, — мускариновыми. Рецепторы центральной нервной системы и периферических парасимпатических постганглионарных рецепторов также преимущественно мускариновые. (В центральной нервной системе позвоночных соотношение мускариновых и никотиновых ацетилхолиновых рецепторов составляет $\sim 3:1$.) В подвздошной кишке и в хвостатом ядре плотность рецепторов (~ 200 рецепторов/ $\mu\text{м}^2$) сравнима с плотностью никотиновых рецепторов в электрической пластинке *Electrophorus*. Их биохимия, однако, изучена хуже, чем у никотиновых рецепторов, в основном из-за того, что здесь нет такого прекрасного инструмента исследования, как α -бунгаротоксин [11]. Разработка специфических аффинных реагентов, образующих ковалентные связи, открыла возможности выделения мускариновых рецепторов. Так, при помощи алкилирующего реагента пропилбензилхилинмустарда (ср. рис. 9.4) удалось определить, что частью рецептора является полипептидная цепь с M 87 000; ее выделение из мембраны затруднено из-за чувствительности к мягким неионным детергентам.

Антагонисты (рис. 8.4) связываются мускариновыми рецепторами мозга и гладких мышц в соответствии с законом действующих масс с коэффициентом Хилла, равным 1, на центрах одного типа. Напротив, связывание агонистов — сложный процесс, который не может быть описан простой константой диссоциации. Если эффективность агониста исследуется по замещению [^3H]антагонистов, то почти всегда получают коэффициенты Хилла меньше единицы и никогда больше единицы. Соответственно сложный характер носят и кривые доза — ответ, измеренные с помощью сокращения полоски подвздошной кишки, вызванного агонистом. Эти результаты показывают, что имеются две различные популяции мускариновых ацетилхолиновых рецепторов. Как и никотиновые, мускариновые рецепторы — аллостерические белки, которые регулируют ионную проницаемость мембраны. Однако эти два типа рецепторов выполняют разные роли: мускариновое возбуждение сопровождается уменьшением проницаемости для калия, а мускариновое ингибирование в других клетках — его увеличением. В каждом случае ответ мускарино-

вой мембраны на действие ацетилхолина значительно медленнее, чем ответ никотиновой. В обеих мембранах после продолжительной инкубации с агонистами наблюдается десенситилизация. Однако в противоположность никотиновой мускариновая активация, по-видимому, сопровождается снижением сродства к агонистам.

Роль мускаринового ацетилхолинового рецептора не ограничивается регуляцией каналов для ионов щелочных металлов, но, как мы уже показали в гл. 2, он влияет на фосфорилирование и дефосфорилирование фосфатидилинозита и стимулирует образование cGMP. Активность рецептора приводит к увеличению внутриклеточной концентрации свободного Ca^{2+} . Молекулярная и функциональная связь этих наблюдений еще неясна.

Катехоламиновые рецепторы

Катехоламины адреналин, норадреналин и допамин действуют через разнообразные рецепторы. Вначале мы рассмотрим *адреноцепторы* — мишени адреналина и норадреналина, а затем — допаминовые рецепторы. В гл. 8 мы уже рассмотрели принцип «множественных рецепторов», который означает, что имеется несколько подтипов рецепторов, взаимодействующих с данным медиатором. Мы предположили, что «целью» такой множественности может быть увеличение числа эффектов, которые может оказывать относительно небольшое число нейромедиаторов. Имеются по крайней мере четыре типа адреноцепторов, называемых α_1 -, α_2 - и β_1 - и β_2 -адреноцепторами (адренэргическими рецепторами), и, возможно, два допаминовых рецептора, называемых D_1 и D_2 . Такое разделение на подтипы не следует оценивать как очень серьезное, так как оно основано главным образом на изучении связывания и на фармакологических свойствах, а не на биохимических различиях выделенных рецепторных белков.

β -Адренэргические рецепторы: взаимодействие рецептора, циклазы и регулятора (R, C и N)*

В гл. 8 мы уже излагали концепцию Алквиста о двух различных адренэргических эффектах. Клетка гладкой мышцы, например, имеет два типа рецепторов для адреналина, α - и β -адренэргические, которые имеют различные фармакологические характеристики; *α -адренэргические рецепторы* вызывают сокращение клетки, когда они взаимодействуют с адреналином; несколько

* Недавно достигнута договоренность между рядом научных лабораторий обозначать GTP-связывающий регуляторный белок буквой G.

Таблица 9.2. Классификация адренэргических рецепторов

Тип рецептора	Активность	Эффект	Механизм
α-Адренэргические			
	Сужение кровеносных сосудов, сокращение матки, ингибирование перистальтики кишечника, расширение зрачка		
α_1	Антагонист празози- на несс иохимбина	Постсинаптический	Агонисты увеличивают центрацию Ca^{2+}
α_2	Антагонист иохимбин на несс празоцина	Прс- и постсинаптический	Агонисты уменьшают центрацию cAMP
β-Адренэргические рецепторы			
	Расширение кровеносных сосудов, ингибирование сокращения матки, стимуляция миокарда		Агонисты увеличивают центрацию cAMP
β_1	Изопреналин активнее адре- налина, примерно равного нор- адrenalину	Жировая ткань (мобилизация жир- ных кислот), стимуляция сердечной мышцы	Дифференциация на подти- пы связана с узнаванием ли- гандов; и β_1 , и β_2 стимулируют аденилатциклазу
β_2	Адреналин намного актив- нее норадреналина	Расширение бронхов, сосудистая недостаточность	

более слабые их агонисты — это норадреналин, фенилэфрин и в меньшей степени изопреналин. Типичные α -блокаторы, т. е. антагонисты — это эргоалкалоиды феноксibenзамин и фентол-амин (рис. 8.19). β -Адренэргические рецепторы в принципе не отличаются от α -рецепторов, но эффекторы действуют на них с другой активностью. Адреналин и норадреналин являются агонистами β -рецепторов и почти так же эффективны для них, как для α -рецепторов. Изопреналин обладает, однако, более сильным действием (в данном случае ответом является релаксация мышечной клетки). Пропранолол и дихлороизопреналин — типичные β -адренэргические антагонисты (табл. 9.2).

β -Рецепторы активируют аденилатциклазу. Мы их рассмотрим здесь подробнее для того, чтобы сравнить в качестве «регуляторов ферментов» с «регулятором ионного канала» — ацетилхолиновым рецептором.

Биохимическая характеристика [12] β -адренэргического рецептора (β_1), как и никотинового ацетилхолинового рецептора, оказалась возможной благодаря двум счастливым открытиям. Так, обнаружилось, что эритроциты птиц являются богатым исходным материалом этих рецепторов и что детергент дигитонин растворяет рецептор, не дезактивируя его. Эритроциты индюка содержат $\sim 0,2$ пмоль β -рецептора/мг мембранного белка; методом аффинной хроматографии не только можно очистить его в 12 000 раз, но и (как ясно показывает кривая элюирования на рис. 9.10, а) отличить от аденилатциклазы, которая не является составной частью рецептора, а представляет собой отдельную субъединицу. Ранее аналогично был выделен аффинной хроматографией GTP-связывающий компонент.

Из этих трех строительных блоков (рецептора, циклазы и GTP-связывающего белка) можно построить модель механизма действия β -адренэргического рецептора, в которой связывающе-му белку отводится роль регулятора или переносчика.

В этой модели (рис. 9.10, в) β -адренэргический рецептор активирует аденилатциклазу не прямо, а посредством GTP-связывающего регуляторного белка. Мы еще вернемся позже к этому GTP-связывающему белку, который обычно называют G, N или G/F и который уже встречался нам ранее под названием «трансдуцин» при обсуждении вопроса усиления в зрительном процессе (гл. 1). Связывание агониста с рецептором приводит к конформационному изменению, которое передается регуляторной субъединице (N) и затем после образования комплекса с GTP — аденилатциклазе. В качестве варианта гипотезы мобильного рецептора (с. 255) это временное взаимодействие между рецептором, N-белком и циклазой было суммировано в «гипотезе коллизионного сопряжения». Действие GTP непродолжительно, так как этот регулятор обладает GTPазной активностью

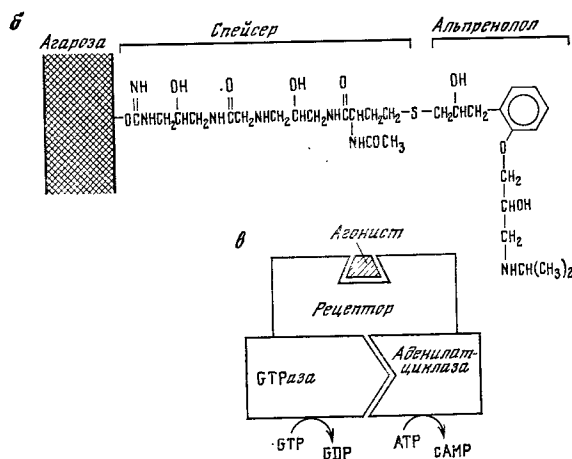
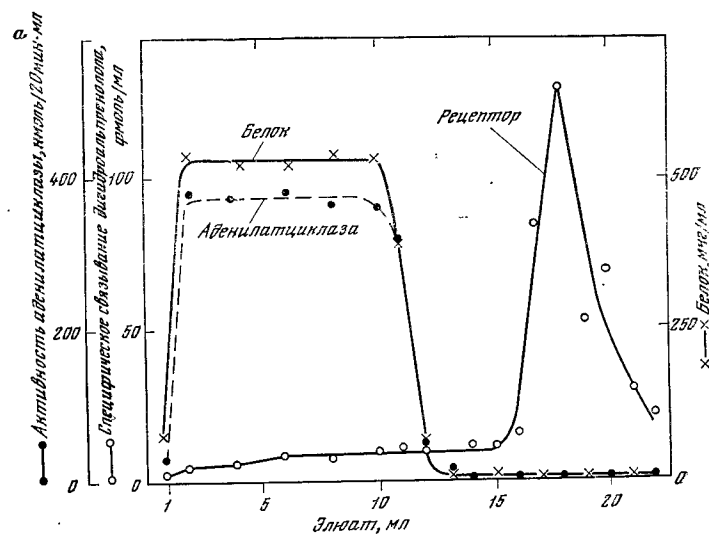


Рис. 9.10. Биохимия β_1 -адренэргического рецептора [12]. а — аффинная хроматография рецептора, солюбилизованного детергентом; аденилатциклаза и рецептор — это действительно физически разделяемые белки, выходящие с колонки каждый отдельно; б — химический состав аффинной смолы: лиганд β -адренэргического рецептора присоединен с помощью спейсера к шарикам агарозы; в — упрощенная модель рецептора как тройного комплекса, состоящего из трех белков: рецептора (связывающего белка R), фермента (аденилатциклазы C) и регуляторного белка, обладающего GTPазной активностью (его называют по-разному — G, G/F или N). Эти три белка на самом деле никогда не располагаются вместе, но стимуляция аденилатциклазой C включает последовательный процесс их функционирования. (Воспроизводится с разрешения автора и Elsevier Science Publishers.)

и поэтому гидролизует свой собственный эффектор. Уровень сАМР в клетке, следовательно, поднимается адреналином или норадреналином под регуляторным контролем гуанидилнуклеотидов.

Это описание не проясняет, однако, вопроса о механизме действия β -адренэргической системы, оно только переносит одну из стадий процесса внутрь клетки. Остаются вопросы: какую роль играет сАМР и как он опосредует физиологическое действие β -адренэргических агонистов? Со времени основополагающих работ Сазерленда сАМР известен как вторичный мессенджер в гормонально- (а не нервно-) стимулируемых тканях, а поскольку становилось известным все большее количество нейромедиаторов с опосредованным сАМР регуляторным действием, появилась необходимость в гипотезе, общей и для гормона, и для медиатора. Грингард предложил такую гипотезу несколько лет назад, и с тех пор она получает все больше экспериментальных подтверждений [13, 14].

Гипотеза Грингарда: сАМР осуществляет регуляцию посредством фосфорилирования белка

В 1968 г. Эдвин Кребс и его коллеги показали, что сАМР-зависимая протеинкиназа участвует в стимуляции гликогенолиза. Позже группа Грингарда обнаружила протеинкиназную активность почти во всех животных тканях, и было постулировано, что сАМР осуществляет свои многочисленные физиологические эффекты посредством этого нового класса ферментов (рис. 9.11, а, 9.12). сАМР-Зависимые протеинкиназы являются тетрамерными ферментами, каждый из которых имеет две регуляторные и две каталитические субъединицы (рис. 9.11, б). Связывание сАМР с регуляторными субъединицами вызывает диссоциацию их каталитических субъединиц, и последние, таким образом, активируются. Протеинкиназа, найденная в основном в нервных тканях, так называемая киназа типа II, фактически фосфорилирует свои собственные регуляторные субъединицы; такое автофосфорилирование не наблюдается у протеинкиназы типа I. Однако механизмы их активации одинаковы.

На рис. 9.13 суммированы возможные центры действия системы сАМР — протеинкиназа в синапсе. Эта система может, например, регулировать пресинаптический синтез медиатора. В гл. 8 мы уже описали активацию с помощью сАМР-зависимого фосфорилирования тирозингидроксилазы — фермента, который катализирует первую лимитирующую стадию синтеза катехоламинов. Кроме того, эта система может влиять пресинаптически на аксональный транспорт медиатора, его экзоцитоз и другие важ-

ные компоненты нейрона. Так, было показано сАМР-зависимое фосфорилирование белкового компонента системой микротрубочек.

Синапсин I — субстрат различных протеинкиназ

Белок, названный синапсином I, является одним из наиболее распространенных субстратов протеинкиназы. По-видимому, это периферический белок синаптических везикул во многих нервных окончаниях. Он содержит многочисленные участки фосфо-

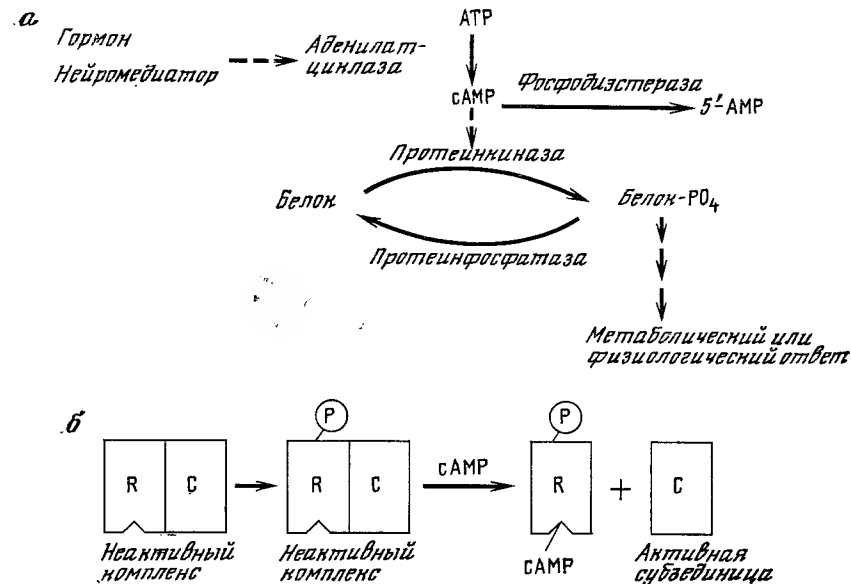


Рис. 9.11. Фосфорилирование белка и сАМР. *а* — схема реакции; *б* — активация сАМР-зависимой протеинкиназы. R — регуляторная и С — каталитическая субъединицы фермента.

рирования, один из которых (участок 1) фосфорилируется как сАМР-зависимой протеинкиназой, так и кальций-кальмодулинзависимой протеинкиназой I. Два других участка (участки 2 и 3) фосфорилируются специфически кальций-кальмодулинзависимой протеинкиназой II. Показано, что это фосфорилирование регулируется серонином, допамином и норадреналином. Оно, по-видимому, связано с регуляцией высвобождения медиатора из нервного окончания. На ДСН-полиакриламидном геле синапсин I проявляется как две полосы, соответствующие компонентам с М 80 000 и 86 000.

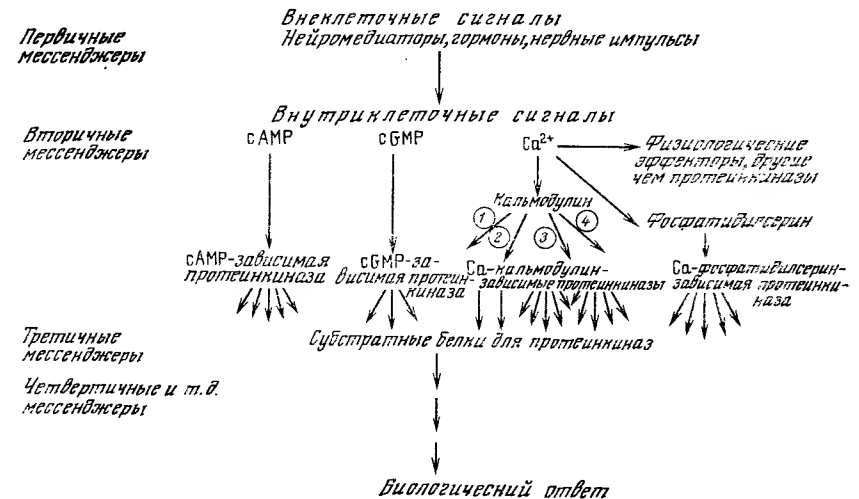


Рис. 9.12. Сигналы в мозге. Внеклеточные сигналы (первичные мессенджеры) вызывают специфические биологические ответы в нейронах-мишенях посредством серии внутриклеточных сигналов (вторичных, третичных и др. мессенджеров). Вторичными мессенджерами мозга являются сАМР, сGMP и Ca²⁺. сАМР и сGMP производят большую часть, а возможно, и все свои эффекты путем соответствующей активации практически одного типа сАМР-зависимой протеинкиназы и одного типа сGMP-зависимой протеинкиназы. Первый фермент проявляет широкую, а второй — более узкую специфичность. Кальций проявляет многие свои посреднические эффекты, как активируя Ca²⁺-зависимые протеинкиназы, так и посредством ряда других физиологических эффекторов. Протеинкиназы он активирует совместно с кальмодулином или фосфатидилсерином. В мозге имеются по крайней мере четыре типа Ca²⁺-кальмодулинзависимых протеинкиназ; 1 — киназа фосфорилазы, которая фосфорилирует только фосфорилазу и, возможно, гликоген-синтазу; 2 — киназа легкой цепи миозина, которая фосфорилирует только легкую цепь; 3 — Ca²⁺-кальмодулинзависимая протеинкиназа I; 4 — Ca²⁺-кальмодулинзависимая протеинкиназа II. Субстратные специфичности последних двух ферментов не установлены, но, видимо, оба фермента фосфорилируют многочисленные белки. Активация индивидуальных протеинкиназ приводит к фосфорилированию специфических белков в нейронах-мишенях. В некоторых случаях эти белки, или третичные мессенджеры, являются, вероятно, прямыми эффекторами биологического ответа. В других случаях они, по-видимому, вызывают биологический ответ опосредовано через четвертичный, пятый, шестой и т. д. мессенджеры. (Воспроизводится с разрешения П. Грингарда.) [14].

Циклические нуклеотиды и Ca²⁺ — два классических «вторичных мессенджера»

Для некоторых гормонов и нейромедиаторов вместо сАМР в качестве регулируемого циклического нуклеотида выступает сGMP (рис. 9.12). Так, если допамин, серотонин, адреналин (для рецепторов β_1 , β_2 , α_2), гистамин (для H₂-рецептора), октопамин и пептидные нейромедиаторы регулируют систему сАМР, то аце-

тилолин (для мускариновых) и гистамин (для H_1 -рецепторов) действуют через систему сGMP. В последней группе, помимо циклического нуклеотида, может действовать еще и другой более быстродействующий вторичный мессенджер. Возможным кандидатом на эту роль является Ca^{2+} , но называют и другие кандидатуры, например IP_3 (гл. 2). Однако несмотря на большее число нейромедиаторов, гормонов и других эффекторов с их множественным действием, имеется, по-видимому, только ограниченное число таких химических мессенджеров. Специфичность действия сAMP, например, в конкретной клетке зависит от субстратной специфичности протеинкиназы и от специфичности рецепторов, находящихся в данной мембране.

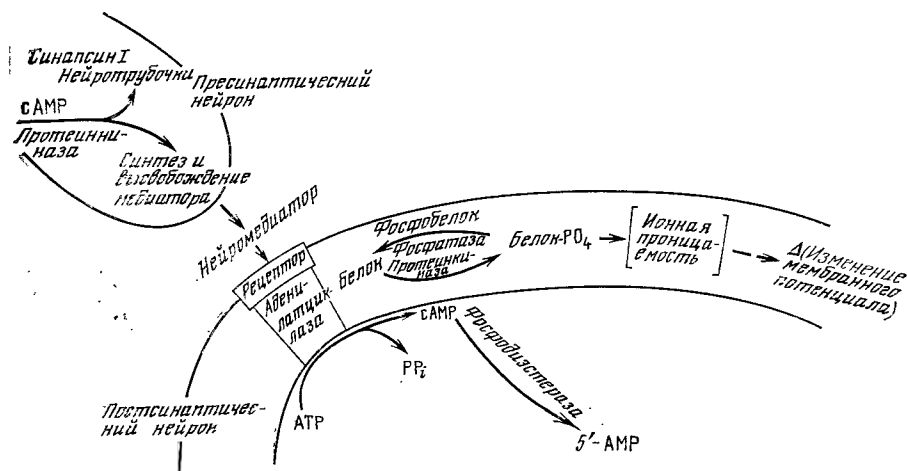


Рис. 9.13. сAMP и функция синапса [13]. (Вопроизводится с разрешения П. Грингарда и Macmillan Journals Ltd.)

Физиологическая регуляция происходит не только путем синтеза и циркуляции активных соединений и химических мессенджеров. Она должна осуществляться также возможностью инактивации циркулирующих сигналов. На уровне циклического нуклеотида сAMP гидролизуется с помощью фосфодиэстеразы до 5'-AMP. На уровне фосфорилированных белков фосфопротеинфосфатазы гарантируют обратимость белкового фосфорилирования.

Недавно наше понимание регуляции нервной функции посредством сAMP усложнилось открытием дополнительных факторов. Мы уже упоминали важную роль ионов Ca^{2+} при высвобождении медиатора (гл. 8). Ионы кальция регулируют также активность аденилатциклазы и фосфодиэстеразы косвенным пу-

тем через Ca^{2+} -связывающий белок, называемый кальмодулином (гл. 10). Тот же белок регулирует фосфорилирование белков синаптосомальной мембраны и здесь ингибируется другим белком кальциневроном. Действие этих новых регуляторов довольно сложно, и выяснение механизма этого процесса — еще предмет дальнейших исследований. В гл. 10 и 11 мы представим дополнительные данные о важной роли, которую играет в нервной активности фосфорилирование, регулируемое вторичными мессенджерами.

α -Адренэргические рецепторы (α -адреноцепторы)

Оба типа β -рецепторов стимулируют аденилатциклазу. Они отличаются участками распознавания лиганда R. С совершенно иной ситуацией мы встречаемся в случае α -адренэргических рецепторов. Здесь, напротив, α_1 регулирует в основном внутриклеточный уровень другого вторичного мессенджера — Ca^{2+} , тогда как α_2 не только не активирует аденилатциклазу, но, по-видимому, и ингибирует ее. В настоящее время считается, что α_2 -рецепторы взаимодействуют с аденилатциклазой (C) через ингибиторный регуляторный белок (N, G). Имеются два различных типа таких регуляторных белков: стимулирующие (N_s) и ингибирующие (N_i). Белки обоих типов были выделены и очищены (из печени, мозга и эритроцитов), была определена и их четвертичная структура. Они состоят из трех различных полипептидов, два из которых (β , γ) идентичны для обоих белков. N-Белки являются также центрами действия экзогенных факторов, таких, например, как F⁻ или бактериальные токсины холеры и коклюша (о структуре и функции токсина холеры см. гл. 2). Краткий обзор современных знаний о структуре и регуляции передачи сигнала через адреноцепторы представлен на рис. 9.14, а и б. Рис. 9.14, б описывает также некоторые детали механизма последовательного взаимодействия R, N и C; видно, что медиатор или гормон вначале активирует N путем взаимодействия с рецептором. Активация N основана на замене GDP на GTP. Активированный N взаимодействует затем с C. Такое взаимодействие носит временный характер, поскольку N инактивирует сам себя путем расщепления связанного GTP под действием присущей ему GTPазной активности. Еще раз интересно отметить сходство этого процесса с взаимодействием родопсина, трансдуцина и фосфодиэстеразы, обнаруженным в зрительном процессе (гл. 1). Такое сходство — это нечто большее, чем просто аналогия.

Модель, приведенная на рис. 9.14, применима также к другим рецепторным системам. Рецептор D_1 допамина активирует аденилатциклазу таким же способом, тогда как D_2 является

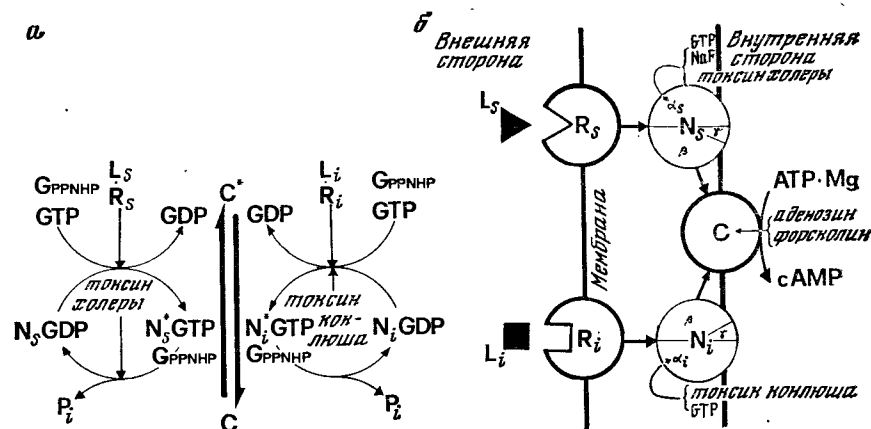


Рис. 9.14. Регуляция мембранно-связанной аденилатциклазы. а — стимулирующие (L_s) или ингибирующие (L_i) медиаторы или гормоны связываются с соответствующими рецепторами (R_s и R_i). Комплекс L-R высокоаффинно взаимодействует с N-белком, вызывая замену GDP на GTP. Комплекс N-GTP диссоциирует от R и активирует (см. левую часть схемы) или ингибирует (правая часть схемы) аденилатциклазу. Активирование прекращается после катализируемого GTPазой, присущей N-белкам, расщепления GTP на GDP и P_i . Согласно этой модели, N-белки осуществляют челночное движение, перенося стимулирующий или ингибирующий сигнал от соответствующего рецептора, находящегося на внешней стороне мембраны, к аденилатциклазе, находящейся на ее внутренней стороне, и претерпевая при этом в циклическом режиме активацию — инактивацию. Активное состояние регуляторных белков* N_s , N_i можно продлить искусственно с помощью G_{ppNHP} или $GTP\gamma S$, аналогов GTP, не расщепляемых GTPазой. Токсин холеры производит такой же эффект, но только на N_s . В то же время токсин коклюша блокирует ингибирующее действие N_i по еще неизвестному механизму. C^* — активированная аденилатциклаза; б — локализация и функционирование компонентов этой системы передачи сигнала. Центром действия регуляторных эффекторов GTP, токсина холеры, $F^-(N_s)$ и GTP и токсина коклюша (N_i) являются соответствующие α -субъединицы N-белков. Дитерпен форсколин активирует аденилатциклазу непосредственно. Аденозин также взаимодействует с этим ферментом непосредственно на внутренней стороне мембраны, связываясь с ингибиторным связывающим участком, называемым «Р-участком» (не смешивать с активирующим аденозиновым рецептором, расположенным на внешней поверхности мембраны).

посредником ингибиторного действия дофамина (см. ниже). Модель может быть дополнительно обобщена включением различных гормональных рецепторных систем. Глюкагон, АКТГ (АСТН), некоторые простагландины и гистамин (рецептор H_2) — примеры стимулирующих эффекторов, а опиаты, включая эндогенные опиоидные пептиды (см. ниже), действуют как ингибиторные эффекторы аденилатциклазы.

* См. примечание на с. 269.

Токсины как инструменты исследования. Токсины холеры и коклюша приводят к ADP-рибозилированию N-белков*

Мы уже сталкивались с примерами использования природных токсинов в качестве инструментов для исследования ключевых нейрохимических механизмов или для выделения важных молекул нервной системы (см. с. 146). Здесь приводится еще один пример такой «технологии». Регуляторные N-белки являются мишенью действия ряда бактериальных экзотоксинов. Как уже указывалось на с. 52 и на рис. 9.14, б, токсин холеры поддерживает постоянную активность аденилатциклазы путем активирования N_s . Механизм этого эффекта основан на ADP-рибозилировании, т. е. переносе ADP-рибозы с NAD на α -субъединицу N_s . Следствием такой ковалентной модификации является диссоциация N_s на субъединицы, причем субъединицей, взаимодействующей с аденилатциклазой, на стадии активации фермента является α_s . В интактном N_s -комплексе этому препятствует β -субъединица, и именно выделение α_s при диссоциации N_s и приводит к активации аденилатциклазы.

Токсин коклюша, белок выделяемый *Bordetella pertussis*, не влияет на N_s , но тормозит ингибиторное действие N_i . Было показано, что этот токсин блокирует взаимодействие R_i и N_i , а также N_i и C путем ADP-рибозилирования α_i -субъединицы (рис. 9.14).

Эти два белка можно использовать для получения важной информации о механизме сопряжения между компонентами циклазной рецепторной системы. Благодаря их способности к ADP-рибозилированию удалось идентифицировать N_s и N_i во многих тканях посредством введения в эти N-белки радиоактивной метки с помощью [^{32}P]NAD в качестве субстрата и их ауторадиографической детекции после электрофореза.

Структуры этих токсинов близки. Они состоят из связывающего участка и полипептидной цепи, обладающей ферментативной активностью (гл. 2).

Допаминовые рецепторы

Допаминовые рецепторы центральной нервной системы могут быть хорошо охарактеризованы, если для исследования использовать ряд радиоактивных лигандов [15, 16]. Эти рецепторы представляют особый интерес для фармакологии, поскольку их сродство *in vitro* к группе нейролептических лекарств (т. е. препаратов, которые снижают или снимают полностью симптомы шизофрении) хорошо коррелирует с нейролептической актив-

* См. примечание на с. 269.

ностью этих лекарств *in vivo* [16]. Болезнь Паркинсона (см. ниже) также связана с повреждением допаминэргических систем (хотя, возможно, и не на уровне рецепторов). Допаминэргические пути центральной нервной системы связаны с основами сознательного человеческого существования: восприятия, эмоций и памяти, что можно считать достаточно веской причиной интенсивного интереса к допамину и его рецепторам.

При анатомическом подходе можно говорить о трех основных допаминэргических системах в мозге высших позвоночных (рис. 9.15):

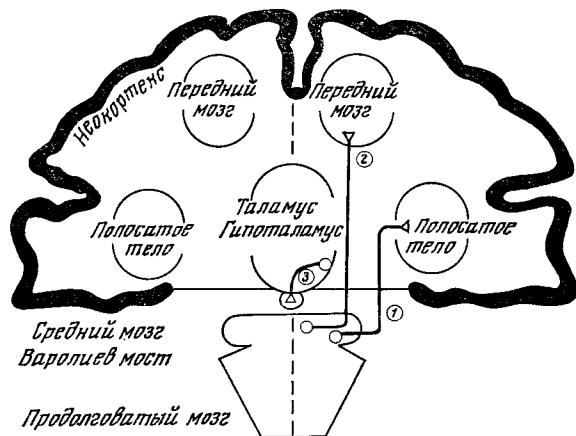


Рис. 9.15. Схема трех основных допаминэргических путей центральной нервной системы (объяснения в тексте).

1. Система черного полосатого тела — часть двигательной системы, связанной с ориентацией в пространстве и движением; она известна также как экстрапирамидная система, соединяющая базальные ганглии со структурами среднего мозга. Тела клеток локализованы в черном веществе (*substantia nigra*), их аксоны проходят вначале в латеральную часть чечевицеобразного ядра (*putamen*) и в хвостовое ядро (*nucleus caudatus*), которые образуют полосатое тело; возникающие в этой системе нарушения вызывают болезнь Паркинсона.

2. Мезокортикальная система. Клетки этой системы локализованы в середине и выше черного вещества, а аксоны проникают в лимбическую систему. Поскольку эта часть мозга ответственна за память и эмоции, она исследуется в связи с умственными и эмоциональными нарушениями.

3. Система серого бугра и гипоталамуса исключительно важна для нейроэндокринной регуляции, т. е. для взаимодействия

между гипоталамусом и гипофизом. Тела ее клеток локализованы в сводчатом ядре среднего возвышения, а аксоны проникают в гипофизарную ножку.

Известно пять основных классов лекарственных препаратов, влияющих на допаминэргическую систему ЦНС: катехоламины, фенотиазины, бутирофеноны, эргоалкалоиды и тиоксантены. Кроме того, сюда относятся и многие другие соединения, например бутакламов, салпирид, пимозид. Некоторые из этих препаратов приведены на рис. 9.16.

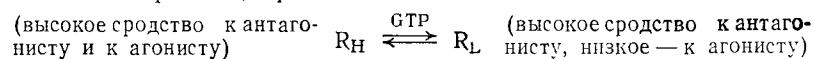
При физиологическом подходе выделяются два типа допаминных рецепторов [17, 16]. Один, D_1 , был открыт Грингардом в 1972 г. Грингард и Иверсен определили его как связывающий центр, который служит для активации аденилатциклазы мозга допамином. D_1 -Рецепторы находятся в полосатом теле, в верхнем червикальном ганглии и в ретине. Функции D_1 в этих тканях неизвестны, но недавно в них обнаружены субстраты для сАМР-зависимой протеинкиназы, которая специфически регулируется при взаимодействии лекарств с D_1 . Допаминовые рецепторы только типа D_1 найдены в параситовидных железах, где они регулируют, как известно, высвобождение паратгормона. Другой тип допаминного рецептора, D_2 , ингибирует аденилатциклазу, возможно, по механизму, который аналогичен показанному на рис. 9.14. Это — единственный тип допаминного рецептора, найденный в передней доле гипофиза (и в *pars intermedia*), где он опосредует допаминэргическое ингибирование высвобождения пролактина. Он также находится в полосатом теле, где его функция пока неизвестна. Рецепторы D_1 и D_2 можно различить по связыванию с селективными лигандами: бутирофеноны, например спироперидол, связываются с D_2 гипофиза быка с $K_D=0,3$ нМ, тогда как их сродство к D_1 на три порядка ниже. Третий тип допаминного рецептора — D_3 — представляет собой, возможно, не индивидуальный рецепторный белок, например авторецептор на пресинаптических мембранах, а лишь состояние рецептора D_1 с другим сродством (константой диссоциации).

Биохимия этих допаминных рецепторов изучена очень плохо. Очистка рецепторных белков оказалась сложной из-за отсутствия богатого источника рецепторов, например число бутирофенонсвязывающих центров (D_2) в полосатом теле мозга быка составляет только 450 фмоль/мг белка или 50 пмоль/г ткани.

Допаминовые рецепторы находятся в двух взаимопревращающихся состояниях. Покажем это на примере D_2 : бутирофеноновый препарат [3 H]спироперидол связывается с D_2 из гипофиза быка с $K_D=0,3$ нМ на центрах одного типа (коэффициент Хилла равен 1). Вытеснение этого антагониста другими антагонистами дает аналогичные характеристики связывания. Вытес-

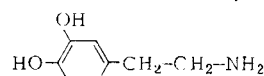
нение же их агонистами демонстрирует отрицательную кооперативность (коэффициент Хилла 0,58) и два типа связывающих центров: один R_L с низким сродством (порядка микромолей), а другой R_H — с более высоким (порядка наномолей). GTP и в еще большей степени его нерасщепляемый аналог GPPNH_P проявляют тот же эффект, т. е. взаимодействуют с центром связывания одного типа (коэффициент Хилла 1) с $K_D = 360$ нМ (R_L).

GTP, вероятно, с помощью GTP-связывающего белка, аналогичного N_i (рис. 9.14), является посредником агонистиндуцированного перехода, протекающего по схеме:

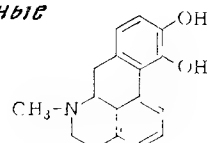


Такое сродство часто измеряется в экспериментах по вытеснению и выражается через K_i или IC_{50} (концентрация ингибитора, необходимая для 50%-ного вытеснения радиоактивно меченного лиганда из связывающего центра). Соотношение между

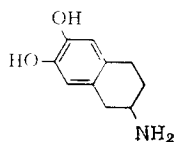
Катехоламиновые производные



допамин

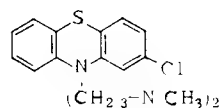


апоморфин

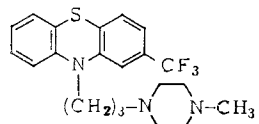


6,7-дигидрокси-2-аминотетралин (ADTN)

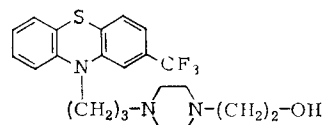
Фенотиазиновые производные



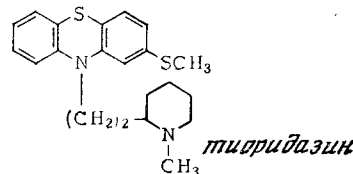
хлорпромазин



трифлуоперазин

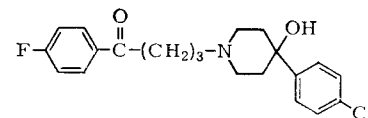


флуфеназин

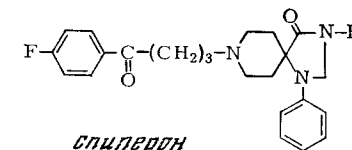


тиридазин

Бутирофеноны

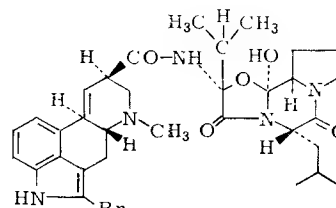


галперидол

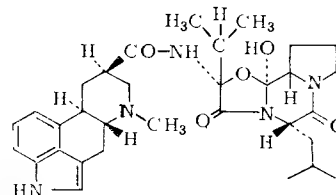


спиперон (спироперидол)

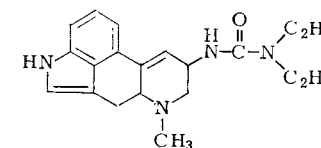
Производные эргалкалоидов



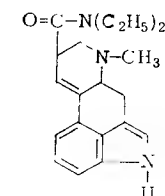
бромкриптин



дигидроэргокриптин (DHEC)

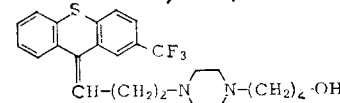


лизурид

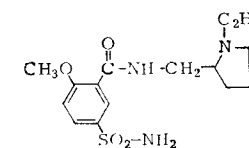


диэтиламид лизергиновой кислоты (LSD)

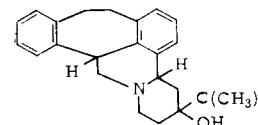
Производные тioxантена и другие препараты



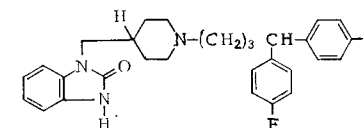
флупентиксол



сульпирид



бутакнамол



пимозид

Рис. 9.16. Некоторые наиболее важные лекарственные препараты, взаимодействующие с допаминовыми рецепторами (см. продолжение на следующей странице).

Рис. 9.16. Продолжение.

K_I , IC_{50} и K_D (константа диссоциации вытесняемого антагониста) выражается формулой:

$$K_I = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[I]}{K_D}},$$

где $[I]$ — концентрация вытесняемого антагониста, а K_D — константа его диссоциации.

Эксперименты по вытеснению очень удобны и широко используются, поскольку дают возможность определить сродство для многих лигандов, когда имеется только один лиганд с достаточно высокой удельной радиоактивностью (в нашем случае антагонист I). Собственно эти эксперименты показали возможное существование двух состояний (рис. 9.2); агонистсвязывающего A и антагонистсвязывающего I , поскольку получены различные величины для сродства (выражаемые в опытах по вытеснению как различные константы ингибирования K_I) к данному лиганду в зависимости от того, замещает он (радиоактивно меченный) агонист или антагонист. Несовпадение значений K_I можно объяснить только предположением, что лиганд связывается с рецептором с различным сродством в зависимости от состояния последнего. Если, например, агонист [3H]допамин вытесняется немеченым допамином, то константа K_I ингибитора равна 17,5 нМ; в то же время если вытесняется антагонист [3H]галоперидол, то для допамина K_I равна 670 нМ. Таким образом, немеченый допамин генерирует форму рецептора со сродством, которое примерно в 40 раз выше для радиоактивного агониста, чем у формы рецептора, образовавшейся при действии антагониста. Антагонист галоперидол имеет сродство к состоянию I ($K_I=1,4$ нМ) в 600 раз выше, чем к состоянию A ($K_I=920$ нМ). (С помощью экспериментов по вытеснению можно также определить, будет ли неизвестное соединение агонистом или антагонистом; такие биохимические тесты очень подходят для фармакологических лабораторий!) Этот метод применим лишь в том случае, когда превращение A в I идет медленно.

Допамин и шизофрения

Нейролептические препараты, особенно фенотиазины и бутирофеноны (рис. 9.16), имеют интересное свойство, которое, возможно, приведет к пониманию причин одного из наиболее распространенных психических заболеваний — шизофрении. Нейролептики — это лекарства, которые ослабляют некоторые из основных симптомов шизофрении, и их активность коррелирует со сродством к D_2 -рецепторам. Поскольку соединения, выско-

божающие допамин, например амфетамины (табл. 8.4), могут вызывать у здоровых людей психозы, напоминающие параноидную шизофрению, логично предположить, что это заболевание связано с какими-то нарушениями допаминэргической системы. В настоящее время такая «допаминовая гипотеза» шизофрении принята многими исследователями, и имеются данные, что в полосатом геле мозга больных, причем даже тех, которые никогда не принимали нейролептики, увеличено число D_2 -рецепторов. Но здесь следует быть очень осторожным. Наблюдаемая корреляция между антипсихотической активностью и сродством нейролептиков к D_2 -рецепторам может быть артефактом: антипсихотическую активность обычно оценивают после продолжительного лечения нейролептиками, что может изменить исследуемую систему. Аналогично и изменения количества рецепторов в мембранах могут быть следствием, а не причиной психического заболевания, и трудно быть уверенным, что не проводилось лечения психофармакологическими препаратами до того, как были получены образцы мозга *post mortem*. Иными словами, не следует пренебрегать и другими теориями о причинах нарушений сознательной деятельности мозга человека, модельной системы которого ни одно животное не может обеспечить. Некоторые исследователи полагают, что норадреналин может регулировать чувствительность допаминовой системы и что эта регуляция претерпевает изменения в мозге больного.

В настоящее время следует считать огромным достижением тот факт, что нейролептики приносят пользу и больным, и клиницистам и что фармаколог может предсказать их активность на основании результатов анализа связывания *in vitro*. Эти методы облегчают поиск лекарственных препаратов. Ситуация с болезнью Паркинсона, еще одним заболеванием центральных допаминэргических путей, выглядит гораздо яснее.

Болезнь Паркинсона

Болезнь Паркинсона — это прогрессирующее, часто фатальное нарушение центральной нервной системы, которое характеризуется ригидностью мышц, затруднениями движения и тремором. Больных узнают по застывшему выражению лица, слегка согнутой окованной позе и замедленным движениями. У некоторых больных основным симптомом является дрожание конечностей. Это заболевание связано с дегенеративным изменением отдела центральной нервной системы, ответственного за двигательный контроль. Обычно оно наступает во второй половине жизни, а его причины и факторы, провоцирующие болезнь, в основном неизвестны. Достижения в области химиотерапии этого заболевания являются классическим примером применения нейробиологии в неврологии.

Заболевание поражает главным образом черное вещество (*substantia nigra*) и полосатое тело мозга — области, богатые допамином. Самое удивительное биохимическое открытие состояло в том, что у больных концентрации допамина, продуктов его деградации (например, гомованилиновой кислоты) и ферментов его биосинтеза (например, тирозингидроксилазы) оказались пониженными. Понимание того, что нарушена функция допаминэргического пути, привело к выработке эффективной терапии: значительное улучшение наблюдается у больных при оральном введении *L*-дигидроксифенилаланина (*L*-DOPA) предшественника допамина. Сам допамин не оказывает никакого действия, так как не проникает через гематоэнцефалический барьер.

На основании терапевтического действия *L*-DOPA можно сделать два заключения: во-первых, процесс его превращения в допамин при болезни Паркинсона не нарушен, и, во-вторых, допаминовые рецепторы все же должны присутствовать, так что дегенерация ограничена пресинаптической областью. Поскольку активность декарбоксилазы очень сильно снижена, был сделан вывод, что ее функцию декарбоксилирования DOPA берут на себя соседние норадренэргические и серотонинэргические нейроны. Образующийся допамин, возможно, диффундирует оттуда к месту своего действия. Увеличение концентрации допамина после применения *L*-DOPA, как показали измерения, тем не менее мало, так что необходимо допустить выработку сверхчувствительности допаминовых рецепторов в постсинаптической мембране рассматриваемых нейронов. Такое предположение может также объяснить удивительную селективность *L*-DOPA, поскольку именно благодаря сверхчувствительности рецепторов допамин, образующийся из экзогенного DOPA, действует в основном здесь, а не в других допаминэргических участках центральной нервной системы.

Только небольшая доля введенного *L*-DOPA достигает места своего действия, и поэтому ежедневные дозы этого препарата составляют 2—15 г. Дозы могут быть значительно снижены, если *L*-DOPA вводить вместе с ингибитором декарбоксилазы, блокирующим его периферическое разложение. Это весьма желательно, так как высокие дозы DOPA могут вызывать вредные побочные эффекты.

Однако побочные эффекты только частично снижают клиническое значение DOPA-терапии. Тошнота, появляющаяся вначале, исчезает через несколько дней. Гораздо хуже появление при таком лечении у больных самопроизвольных, неконтролируемых движений, которые наблюдаются у более чем 70% больных. Могут появляться также эмоциональные изменения и изменения в поведении — от беспокойства и нарушения сна до психозов.

Наконец, наиболее опасными побочными действиями препарата являются нарушения деятельности сердца и кровеносных сосудов. В отдельных случаях при долгом лечении *L*-DOPA происходят такие серьезные нарушения сердечного ритма, что прием лекарства приходится прекратить.

Опиатные рецепторы

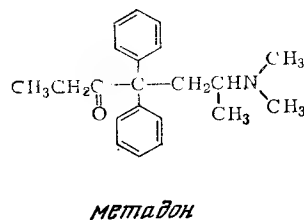
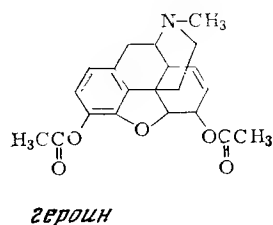
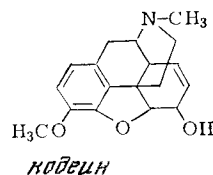
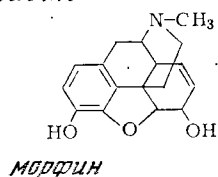
Когда древние греки дали имя Морфей богу сновидений, они не могли и вообразить, какое значение оно приобретет в молекулярной нейробиологии и фармакологии! Морфин назван по имени бога сновидений. Этот алкалоид, выделенный из млечного сока незрелых коробочек мака, а также опиаты, его производные, нашли применение при характеристике рецепторов центральной нервной системы, имеющих отношение к болевой чувствительности. Поскольку такие рецепторы в норме являются центрами действия эндогенных физиологически активных соединений, открытие морфиновых рецепторов заставило предположить, что имеется и эндогенное вещество по своему действию, но совсем не обязательно по структуре, подобное экзогенному лекарственному препарату. Это стало предпосылкой для выделения пептидов, подобных по действию опиатам, — эндорфина, динарфина и энкефалинов; они, вероятно, являются медиаторами в мозге (гл. 8). Молекулярная структура центра связывания опиатов и энкефалинов, т. е. опиатного рецептора (сейчас очевидно, что их несколько; см. ниже), исследуется все возрастающими темпами [18]. Опиатный рецептор стереоспецифичен, он связывает только (—)-изомеры опиатов (рис. 9.17) и различает агонисты и антагонисты. Сродство агонистов коррелирует с их биологической активностью и измеряется как ингибирование сокращения подвздошной кишки морской свинки, вызываемое электростимуляцией. Достаточно странно, что опиатные рецепторы, помимо центральной нервной системы, найдены только в пищеварительном тракте и в семявыводящем протоке (*vag deferens*) мыши. Здесь, однако, их функции не выяснены.

При заполнении связывающих центров на 50% достигается половина максимальной активности, так что, очевидно, здесь нет «резервных рецепторов» с более низким сродством, которые активируются при более высокой концентрации агониста, как это было постулировано для других рецепторов. Опиатный рецептор содержит функционально важную SH-группу, что можно считать первым свидетельством его белковой природы.

Опиатные рецепторы существуют в двух взаимопревращающихся формах, одна из которых имеет высокое сродство к агонистам, а другая — к антагонистам (рис. 9.18). Такая взаимопревращаемость, вероятно, возникает как следствие конформа-

ционных изменений, вызываемых Na^+ . Этот вывод вытекает из наблюдения, что Na^+ в концентрации 1 мМ уменьшает сродство к агонистам и повышает сродство к антагонистам. Ионы K^+ , Rb^+ и Cs^+ не оказывают такого эффекта, а Li^+ действует очень слабо. По-видимому, Na^+ закрепляет рецептор в антагонистсвязывающей конформации. Это также объясняет более высокую эффективность опиатных антагонистов *in vivo*: в мозге концентрация Na^+ высокая, и опиатный рецептор существует преимущественно в «состоянии антагониста».

Агонисты



Антагонисты

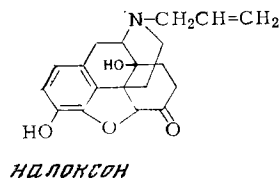
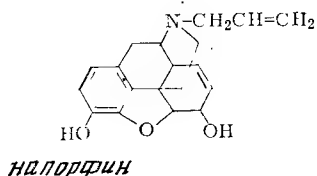


Рис. 9.17. Опиаты: агонисты и антагонисты.

Как показывает уже название данного раздела, имеется несколько опиатных рецепторов; это еще один пример концепции «множественных рецепторов» (гл. 8). Сейчас относительно хорошо охарактеризованы три типа опиатных рецепторов μ , κ и δ . Четвертый тип, обнаруженный по преимуществу связыванию лиганда N-аллилнорметазоцина (SKF 10047) и называемый в некоторых работах σ -рецептором, рассматривается как истинный опиатный рецептор не всеми исследователями. Тип рецептора трудно идентифицировать из-за отсутствия специфических

лигандов. Наибольшую селективность проявляет κ -рецептор, который связывает только динорфин (и Leu-энкефалин с удлиненной C-концевой последовательностью). κ -Рецепторы находят главным образом в спинном мозге, где они, по-видимому, участвуют в регуляции передачи болевых сигналов. Энкефалины связываются с μ - и δ -рецепторами, причем чуть лучше с μ -рецептором.

В настоящее время неясно, представляют ли собой эти несколько опиатных рецепторов различные рецепторные белки или только различные конформационные состояния одной молекулы. Так, было заявлено, что в полосатом теле мозга быка обнаружено взаимопревращение (зависящее от Na^+ и GTP) μ - и δ -рецепторов. Биохимия этого очень интересного направления делает еще только первые шаги.

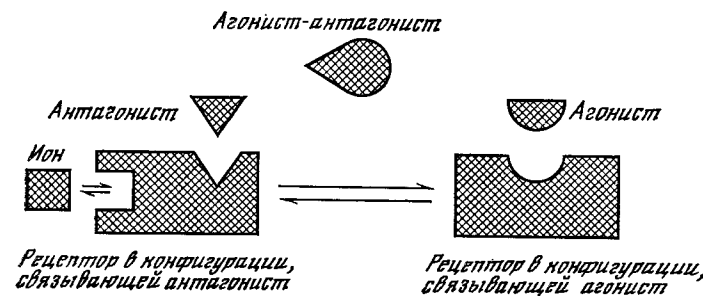


Рис. 9.18. Опиатный рецептор: модель двух состояний. Ионы Na^+ способствуют переходу из конфигурации, связывающей агонист, в конфигурацию, связывающую антагонист.

Пресинаптическое ингибирование опиатами

Опиаты обладают как анальгетическим, так и эйфорическим действием. Распределение опиатных рецепторов в головном мозге было исследовано с помощью радиоактивно меченных лигандов и флуоресцентно меченных антител против энкефалинов. Особенно большая плотность рецепторов обнаружена в лимбической системе — эволюционно самом древнем отделе, который отвечает за эмоциональное возбуждение и в котором локализованы эйфорические и эмоциональные компоненты болеутоляющего действия опиатов [19]. В спинном мозге они непосредственно действуют на проводимость болевых ощущений. Исследование этого отдела ЦНС как раз дает прямые доказательства физиологической роли опиатных рецепторов. Они являются, вероятно, пресинаптическими соединениями и поэтому их следует искать в нервных окончаниях. Отмечалось, что опиаты ингибируют высвобождение вещества Р [20] — соединения, которое, как пола-

гают, выполняет роль нейромедиатора нервного болевго пути. В этой модели на нервное окончание возбуждающего нейрона должен действовать эндогенный опиат энкефалин (рис. 9.19). Там он вызывает ингибирование высвобождения медиатора по еще неизвестному механизму (возможно, путем блокирования входа в клетку кальция, необходимого для экзоцитоза вещества Р в синаптическую щель).

Привыкание к лекарствам и лекарственная зависимость. Молекулярная модель

Применение опиатов в медицине ограничено из-за того, что их болеутоляющее действие со временем уменьшается, что делает необходимым постоянное увеличение доз. Это явление известно

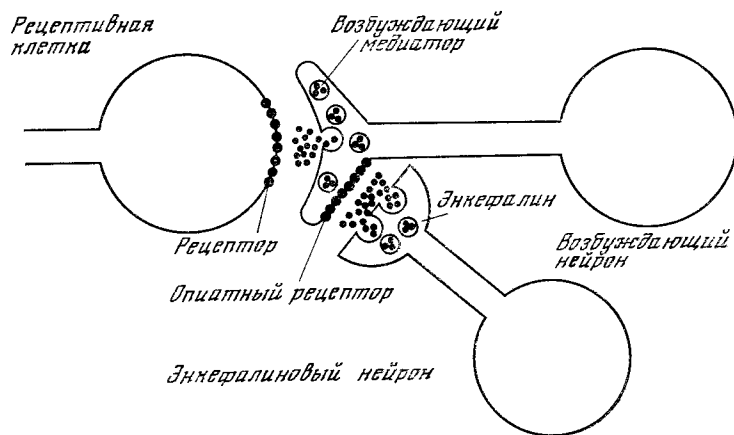


Рис. 9.19. Гипотетическая модель пресинаптического ингибирования энкефалином проводимости болевго сигнала (возбуждающий нейромедиатор, вероятно, вещество Р) [19]. (Воспроизводится с разрешения авторов и Macmillan Journals Ltd.)

как привыкание к лекарствам, или толерантность. Привыкание, как и лекарственную зависимость, нельзя преодолеть, даже если постоянно разрабатывать все новые и новые опиаты. Лекарственная зависимость (наркомания), т. е. синдром «я не могу жить без лекарства», имеет не психическую природу, а вполне реальную физиологическую. Изучение гибридных клеток нейробластомы (рис. 9.20, см. также гл. 12) позволило сделать, правда, весьма осторожные предположения о возможном молекулярном механизме этого заболевания: здесь, как и *in vivo*, опиаты, в том числе эндогенные, ингибируют аденилатциклазу клеточной мембраны и, таким образом, снижают концентрацию

cAMP [21]. Этот эффект, однако, носит временный характер, так как клетка компенсирует ингибированный фермент синтезом его дополнительных порций.

Более высокая суммарная концентрация фермента требует более высокой концентрации опиата для достижения такого же ингибиторного действия. Это точно соответствует медицинскому определению привыкания. Если затем ингибитор удалить отмывкой, то концентрация cAMP достигает значительно более высокого уровня, чем в норме, поскольку в клетке присутствует значительно больше нормального количества циклазы. Из-за множественности действия этого фермента на клеточный мета-

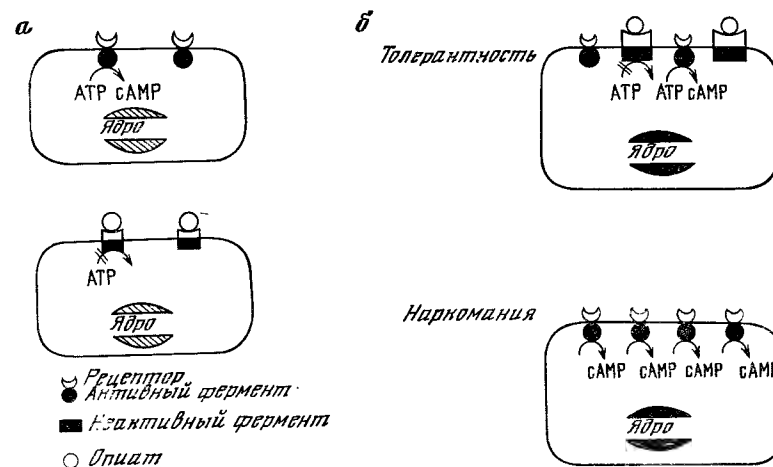


Рис. 9.20. Толерантность и наркомания: молекулярные модели действия опиатов. а — опиат блокирует аденилатциклазу; б — блокированные комплексы аденилатциклазы замещаются новыми комплексами (толерантность, привыкание). После удаления опиата общая циклазная активность увеличивается; избыток cAMP вызывает снятие симптомов (наркомания) [21].

болизм его избыток сдвигает метаболический баланс и происходит нарушение деятельности клетки, подобное синдрому абстиненции (лишения) у человека, зависимого от лекарства. Клетка теперь нуждается в опиатах в качестве ингибитора, становится лекарственно зависимой.

В этой серии экспериментов было показано, что число и сродство рецепторов не менялись, и, следовательно, только циклаза в первую очередь гипертрофировалась в ответ на ингибирование. (Эти данные можно рассматривать как дальнейшее подтверждение модели «плавающего рецептора».) Можно выдвинуть теорию, что аналогом «гипертрофии» как ответа на растущее высвобождение медиатора являются процессы пластич-

ности (гл. 11), лежащие в основе обучаемости и памяти. Пока еще трудно сказать, почему эндогенные опиаты не вызывают привыкания и зависимости. Для этого случая постулирован контроль высвобождения опиата, действующий по механизму обратной связи и поддерживающий постоянную концентрацию опиата в синаптической щели.

Рецепторы GABA — ингибиторные и аллостерические белковые комплексы

Как уже отмечалось в гл. 8, GABA, а также глицин — это основные ингибиторные медиаторы в центральной нервной системе. GABA осуществляет ингибирование, открывая Cl^- -каналы и гиперполяризуя таким способом постсинаптическую мембрану. Система GABA — хлорный канал заслуживает особого внимания, так как многочисленные лекарства — транквилизаторы (например, диазепины и барбитураты) и конвульсанты (типа биксукуллина и пикротоксина) — взаимодействуют с этой системой. Рецептор GABA из мозга различных позвоночных недавно выделен Барнардом и сотр. Эти исследователи обнаружили и выделили индивидуальный белок с M 220 000, содержащий центры связывания с агонистами и антагонистами GABA, бенздиазепинами (об агонистах и антагонистах см. с. 231), барбитуратами и хлоридзависимыми конвульсантами. Была определена четвертичная структура рецептора $\alpha_2\beta_2$, а мРНК, кодирующая этот рецептор, была выделена из мозга и транслирована в ооцитах *Xenopus*.

Большая часть исследований этой системы до сих пор касалась изучения связывания и фармакологии *in vivo*. Результаты этих исследований привели к следующим выводам.

Эффект GABA осуществляется через специфический рецептор, который может быть группой отдельных хорошо различных подтипов рецепторов или набором множественных состояний одного типа рецептора. Идентифицированы GABA₁- и GABA₂-рецепторы с низким и высоким сродством к агонисту. GABA₂-рецепторы распределяются достаточно равномерно по всем отделам мозга, тогда как GABA₁-рецепторы более распространены в мозжечке, коре головного мозга и гипоталамусе, чем в других отделах (например, в черном веществе или половом теле). Агонисты GABA и мусцимол связываются с центром узнавания GABA на рецепторе. Среди антагонистов биксукуллин конкурирует с GABA за связывание с этим ее центром, а пикротоксин, по-видимому, взаимодействует с Cl^- -каналом.

Бенздиазепины и барбитураты аллостерически усиливают действие GABA

Наряду с центрами, связывающими GABA и пикротоксин, имеется еще несколько эффекторсвязывающих центров, которые взаимодействуют с комплексом GABA-рецептор — Cl^- -канал. II бенздиазепины, и барбитураты увеличивают ингибиторное действие GABA. Для бенздиазепинов [22] и барбитуратов были постулированы отдельные рецепторы, но согласно определению рецептора, данному в начале этой главы, мы должны назвать их просто «связывающими центрами», поскольку для них не были найдены эндогенные лиганды. Но как только удастся однозначно обнаружить такой лиганд, эти связывающие центры сразу станут рассматриваться как истинные рецепторы. Последние несколько лет проводился энергичный поиск эндогенного лиганда, соответствующего бенздиазепинам [23]. Такое соединение было бы исключительно интересным. Применение бенздиазепинов (например, валиума, либриума и других аналогичных популярных транквилизаторов, число которых на этом доходном рынке составляет более двух десятков) оказывает четырехсторонний эффект. Они обладают седативным и анксиолитическим действием, являются антиконвульсантами и релаксантами мышц. Их применяют при стрессе и беспокойстве, прописывают при эпилепсии, а преанестезия почти всегда начинается с введения бенздиазепина. Если все эти эффекты нормально опосредуются эндогенным аналогом бенздиазепинов, то его обнаружение было бы исключительно важным, так как он вполне мог бы оказаться ответственным за многие основные характеристики нашего психического состояния, а также за многие патологические нарушения, причиняющие большие страдания.

Поиски эндогенного лиганда рецептора бенздиазепинов выявили много кандидатов, но ни один из них не может пока успешно претендовать на эту роль [23]. Инозин и гипоксантин, никотинамид, тромбосан, гарман и этиловый эфир β -карболин-3-карбоновой кислоты рассматривались неоднократно в этом качестве из-за их высокого сродства к диазепинсвязывающим центрам. Некоторые из этих лигандов не являются даже истинными эндогенными соединениями, а представляют собой просто артефакты выделения. Но их изучение оказалось весьма полезным и привело к открытию мощных антагонистов бенздиазепина (например, производных β -карболинкарбоновой кислоты) и даже так называемых «обратных агонистов» — соединений, обнаруживающих эффекты, противоположные диазепиновым.

Поиск в этом направлении продолжается. Один из важных результатов этих исследований состоит в открытии нового нейропептида центральной нервной системы, названного GABA-мо-

дулином. Это — пептид с $M 16\,500$, который вызывает неконкурентное уменьшение числа $GABA_2$ -рецепторов. Он, видимо, является аллостерическим регулятором, и на него в свою очередь оказывает влияние связывание диазепаина. $GABA$ -модулин блокирует $GABA$ -стимуляцию связывания диазепаина. Физиологическую роль этого пептида еще предстоит выяснить.

В заключение следует сказать, что ингибиторный нейромедиатор $GABA$, видимо, действует через сложный белковый комплекс, состоящий из центра узнавания $GABA$ и Cl^- -канала и представляющий собой, вероятно, аллостерический белок, существующий в нескольких состояниях с различным средством и регулируемый различными аллостерическими (и стерическими) эффекторами [24]. Снова мы должны быть осторожными и не называть каждый вновь открытый связывающий центр «рецептором», так как многие наиболее важные лекарства, которые действуют, изменяя ингибиторное действие $GABA$ (например, барбитураты и бенздиазепины), могут просто взаимодействовать с различными аллостерическими связывающими центрами на $GABA$ -рецепторном комплексе. Работы с очищенными рецепторами $GABA$ подтверждают эту концепцию.

Глициновые рецепторы также являются ингибиторными; они первыми выделены из центральной нервной системы

В то время как $GABA$ — наиболее важный ингибиторный медиатор в мозге, глицин в основном выполняет эту роль в спинном мозге и стволе мозга. Возможные медиаторы и β -аланин также являются ингибиторными агонистами глицинового рецептора, а наиболее мощный экзогенный антагонист — это стрихнин, алкалоид из *Strychnos nux vomica*. Стрихнин не блокирует ингибиторные эффекты, опосредованные рецепторами $GABA$, тогда как антагонист $GABA$ бикакуллин не блокирует глициновые рецепторы. Глициновый рецептор связан с Cl^- -каналом, который опять-таки не является тем же каналом, который связан с $GABA$ -рецептором.

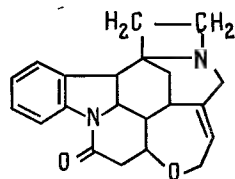


Рис. 9.21. Стрихнин. (В группе H_2C-CH_2 левая метиленовая группа связана с углеродом, общим для пятичленного и шестичленного кольца, т. е. должна сдвинута влево на один углерод циклогексильного фрагмента.)

Природный токсин стрихнин (рис. 9.21) оказался полезным инструментом для выделения и биохимической характеристики глицинового рецептора. Его $[^3H]$ производное имеет сродство, достаточно высокое для того, чтобы его можно было использовать в тестах связывания рецепторного белка ($K_D = 11,3$ нМ), а иммобилизация стрихнина на аффинной колонке позволила Бенцу и сотр. очистить рецептор, солюбилизованный тритоном, в 1000 раз за одну стадию. Более того, будучи фоточувствительным соединением, стрихнин оказался и без химической модификации удобной фотоаффинной меткой. УФ-облучение комплекса стрихнина и рецептора приводит к ковалентному мечению только одного полипептида ($M 48\,000$).

Этот первый рецептор нейромедиатора, выделенный из центральной нервной системы, имеет следующие биохимические характеристики: он является гликопротеином, состоящим из нескольких полипептидных цепей (по данным электрофореза в ДСН-полиакриламидном геле $M 48\,000$, $59\,000$ и $92\,000$); центр связывания стрихнина, по-видимому, локализован на самой короткой полипептидной цепи, и функции других цепей в настоящее время неизвестны; рецепторный белок содержит единственный тип независимых связывающих участков для стрихнина.

Концентрационная зависимость вытеснения стрихнина из его связывающего центра глицином имеет сигмоидальный характер, что предполагает модель двух состояний для глицинового рецептора, подобную той, которая принята для других ранее описанных рецепторов. Коэффициент Хилла для вытеснения стрихнина глицином равен 1,7. Глицин и стрихнин, видимо, не конкурируют, а действуют кооперативно, взаимодействуя с двумя разными участками рецептора. Взаимодействие между агонистом и антагонистом снимается N -этилмалеимидом (NEM). Полагают, что стрихнин связывается с Cl^- -каналом. В растворе глициновый рецептор может быть стабилизирован фосфолипидами, его коэффициент седиментации в детергенте составляет 8,3. $GABA$ имеет низкое сродство к глициновому рецептору.

Глутаматные, серотониновые и многие другие интересные рецепторы еще не выделены

Дополняющими действие ингибиторных медиаторов $GABA$ и глицина являются аминокислотные медиаторы глутамат и аспартат; их особенно много в гиппокампе. Поскольку предполагается, что глутамат принимает участие в длительных синаптических изменениях, связанных с обучаемостью и памятью, этот отдел мозга исследован наиболее тщательно. Однако и дру-

гие отделы, например мозжечок и кора мозга, также содержат значительные концентрации этих возбуждающих медиаторов.

В гиппокампе и других органах имеется по крайней мере два типа глутаматных рецепторов, причем один из них зависит от концентрации Na^+ , а другой — нет. Число рецепторов гиппокампа увеличивается при стимуляции. Этот эффект носит долговременный характер, коррелирует с постсинаптической «потенциацией» (гл. 11) и, что интересно, связан, по-видимому, с Ca^{2+} -зависимым протеолизом периферического мембранного белка (названного фодрином), осуществляемым тиловой протеазой кальпаином I [25].

Имеется несколько структурных аналогов возбуждающего медиатора глутамата, которые являются конвульсантами, а при более высоких концентрациях — нейротоксичными агентами. Один из наиболее мощных агонистов — каиновая кислота (рис. 8.26); она используется для создания специфических очагов поражения (с. 232), но не конкурирует с глутаматом за общий рецептор.

Рецепторы серотонина (5-гидрокситриптаминовые; или 5-НТ-рецепторы) также действуют как «множественные». НТ₁ имеет сродство к серотонину (K_D порядка нМ) и, вероятно, связан со стимулирующим GTP-зависимым N-белком и аденилатциклазой. Напротив, НТ₂ имеет низкое сродство к серотонину. И НТ₁, и НТ₂ связывают серотонинэргический антагонист LSD с высоким сродством. По-видимому, рецепторы серотонина участвуют в регуляции сна, настроения и восприятия боли и отвечают за такие нарушения, как депрессия и синдром Каннера. НТ₁ был солюбилизован из мембран коры мозга быка детергентами; согласно предварительным данным это белок с $M 58\,000$, существующий во взаимопревращающихся состояниях с различным сродством к эффекторам.

Рецептор серотонина особенно интересен как один из возможных связывающих центров галлюциногенных соединений, например диэтиламида лизергиновой кислоты (LSD). Он связывает серотонин, и LSD вытесняется из него с отрицательной кооперативностью (коэффициент Хилла 0,5), т. е. каждое соединение связывается с рецептором в одной из его конформаций. Здесь применимы те же соображения, что и ранее: имеются чистые агонисты (производные триптамина) и антагонисты; но LSD может играть роль и агониста, и антагониста. Агонисты блокируют связывание серотонина на один-два порядка эффективности, чем LSD. Антагонисты, напротив, лучше блокируют связывание LSD. Таким образом, как и в случае ранее обсуждавшихся рецепторов, картина в целом соответствует модели двух состояний, хотя прямых доказательств этого очень мало.

Ауторецепторы и некоторые замечания, касающиеся тонкой регуляции нервной активности

До сих пор мы представляли рецепторы почти исключительно как постсинаптические структуры. Однако уже есть данные о том, что, например, моноаминовые медиаторы также влияют пресинаптически на свое собственное высвобождение. Это приводит к интересной возможности регуляции синаптической передачи: концентрация медиаторов в синаптической щели регулирует высвобождение медиатора по сигналу обратной связи, который воспринимается и ретранслируется пресинаптическими рецепторами.

Местная локализация рецептора может также влиять на синаптическую функцию другим способом. Структура холинэргической концевой пластинки (рис. 8.2) была представлена как прототип синапса. Моноаминэргические нервные окончания симпатических нейронов, напротив, образуют «утолщения» (рис. 9.20), геометрия которых сильно отличается от геометрии нейромышечного синапса. Здесь рецепторы, вероятно, не концентрируются до такой же степени в специализированных структурах (пресинаптических уплотнениях). Путь медиатора до рецептора может быть таким способом удлинён и перенос информации модулирован путем взаимодействия с другими участками высвобождения медиатора.

Кроме того, ауторецепторы имеются в холинэргическом и других синапсах. Недавно в синапсоммах из электрического органа *Torpedo*, служащих моделью нервно-мышечной передачи, открытой и изученной Уиттейкером, были обнаружены ацетилхолиновые рецепторы, в которых высвобождение ацетилхолина блокировалось при присоединении агонистов. В противоположность никотиновому рецептору постсинаптической мембраны эти пресинаптические рецепторы оказались мускариновыми. Здесь, по-видимому, также ауторецептор принимает сигнал обратной связи, регулирующий высвобождение медиатора.

За последние годы стало очевидным, что такого рода модуляторные эффекты играют важную роль при нейрональной активности. Так, в гл. 8 уже упоминались иммуногистохимические данные о том, что ряд нейропептидов упакован в нервных окончаниях вместе с классическими нейромедиаторами. Было найдено, например, что энкефалины существуют в некоторых нервах с адреналином и норадреналином или также с серотонином и ацетилхолином. В других синапсах вместе с серотонином или ацетилхолином было обнаружено вещество P — хорошо известный медиатор ряда нервных путей. В этих случаях пептид, очевидно, модулирует действие медиатора, и такой модулирован-

ный эффект оказывается значительно более длительным, чем эффект одного только нейромедиатора.

Даже при простом проведении нервного импульса следует учитывать, что элементарный ответ «все или ничего» может подвергаться значительной модуляции. В гл. 11 показано, что «нервная пластичность» основана на модуляторных взаимодействиях различных эффекторов: например, усиление чувствительности рефлекса втягивания жабр у моллюсков *Aplysia* — поведения, используемого в качестве модели обучения — основано на модуляции аксональных калиевых каналов. Сама эта модуляция осуществляется с помощью серотонина, который, активируя вторичный мессенджер cAMP, стимулирует фосфорилирование специфического типа калиевых каналов и ингибирует тем самым их закрывание, удлиняя продолжительность потенциала действия [26]. Это, вероятно, только крайний случай среди большой группы модуляторных эффектов, значительно отличающихся и по силе, и по механизму.

Рецепторы находятся под регуляторным контролем

Рецепторы, будучи первичными приемниками внеклеточных сигналов, гибко реагируют на их интенсивность. Они являются регуляторными белками, и на их активность влияют различные факторы типа тех, которые были обсуждены выше. Суммируя механизм регуляции, можно сказать, что активность рецепторов, включая рецепторы гормонов и медиаторов, регулируется, во-первых, числом рецепторов и, во-вторых, их сродством к эффекторам.

Плотность рецепторов может либо варьировать абсолютно, т. е. меняться их число, приходящееся на единицу всей поверхности клетки, либо локально — на определенных участках клеточной поверхности. Примером реализации первой возможности является сверхчувствительность к ацетилхолину после денервации мышечного волокна, а примером второй — *петтинг* и *кенинг*, т. е. образование агрегатов рецепторов и их концентрирование на одном «полюсе» клетки. Местные увеличения концентрации рецептора могут промотироваться лигандами и, кроме того, полимеризующими агентами типа лектинов и антител (одновалентные Fab-фрагменты в отличие от их двухвалентных предшественников петтинга не вызывают). Сама по себе полимеризация может оказаться достаточной для регулирования, как это показано на примере инсулинподобного действия лектинов на инсулиновые рецепторы. Абсолютное число рецепторов на клетку уменьшается, если концентрация повышается на значительное время, но не все лиганды вызывают такой ответ, а только сам агонист, если он присутствует в избытке. Таким

образом, β -адренэргические агонисты уменьшают число β -адренэргических рецепторов в эритроцитах лягушки, а антагонист пропранолол ингибирует этот эффект, но не может сам вызывать его.

Уменьшение числа рецепторов обычно происходит вследствие «интернализации» комплекса рецептор — лиганд, что показано, например, в случае рецепторов инсулина и фактора роста нерва (NGF). Впоследствии этот комплекс разрушается лизосомами. Цель этого механизма регуляции, без сомнения, состоит в компенсации избытка лиганда путем ослабления ответа клетки. Регуляция активности рецептора с помощью изменения сродства, например десенсibilизация ацетилхолинового рецептора посредством инкубации с ацетилхолином (см. с. 263), служит той же цели. Десенсibilизация описана для многих рецепторов. В β -адренэргическом рецепторе она основана на синергическом уменьшении сродства к медиатору и на увеличении сродства к аденилатциклазе, связанном с фосфорилированием рецептора.

Мы уже встречались с обратным процессом: опийный рецептор компенсирует рецепторы, занятые лигандами, путем увеличения числа рецептор-циклазных комплексов. В конечном итоге это приводит к гиперсенсibilизации.

Выводы

Рецепторы являются белками, которые, будучи центрами связывания и действия физиологических эффекторов (гормонов, нейромедиаторов), передают внеклеточные сигналы внутрь клетки. Они состоят из узнающих и связывающих белков, принимающих сигнал, и из эффектора, трансформирующего этот сигнал в определенный эффект. Эффектор может быть ионным каналом, транспортной системой или ферментом. Мы обсуждали различные модели механизма сопряжения связывания лиганда (гормона, медиатора) и его действия; самая вероятная из них основана на аллостерической модификации рецепторного белка. Функции связывания и осуществление эффекта относятся, возможно, к различным субъединицам рецепторного комплекса. В качестве примера можно привести гормончувствительную аденилатциклазу, которая в качестве эффектора может быть отделена от связывающего участка и биохимически очищена. Согласно гипотезе плавающего рецептора, этот фермент латерально диффундирует в клеточной мембране и регулируется разнообразными рецепторами. Внеклеточный сигнал переносится к этому ферменту через третий компонент — группу сопрягающих белков, называемых N-белками. Они могут обладать стимулирующим (N_s) или ингибирующим (N_i) действием. В свою очередь N-белки активируются GTP, а функция рецеп-

тора, по-видимому, заключается в запуске обмена связанного GDP на GTP. Действие сигнала прекращается путем гидролиза связанного GTP с помощью GTPазной активности, присущей N-белку.

Имеется относительно немного нейромедиаторов, но вариативность их действия увеличивается благодаря множественности рецепторов, т. е., как правило, имеется более одного типа рецепторов, взаимодействующих с данным медиатором. Эту концепцию подтверждают следующие примеры: адреноцепторы (α_1 , α_2 , β_1 , β_2), допаминовые рецепторы (D_1 , D_2), холинэргические рецепторы (мускариновый и никотиновый) и опиатные рецепторы (μ , κ , δ).

Комплекс никотинового ацетилхолинового рецептора является связывающим белком и ионным каналом для Na^+ и K^+ ; это первый рецептор, выделенный и биохимически охарактеризованный. Рецепторы ингибиторного нейромедиатора GABA и глицина, регулирующие Cl^- -каналы, принадлежат к тому же типу, а рецепторы, действующие с помощью «вторичного мессенджера», — допаминовые и опиатные — принадлежат к β -адренэргическому типу.

Физиологически рецепторы функционируют как регуляторные белки. Число, родство и активность рецепторов находятся под контролем различных механизмов регуляции. Они также являются местом действия многочисленных экзогенных эффекторов, а именно лекарств и токсинов. Некоторые заболевания нервной системы имеют рецепторную природу (миастения и, возможно, шизофрения). Некоторые, так называемые рецепторы, особенно участки связывания лекарств, могут быть в действительности регуляторными связывающими центрами или субъединицами истинных комплексов нейромедиатор — рецептор. Таким образом, мягкие транквилизаторы, бенздиазепины и барбитураты, которые усиливают ингибиторное действие GABA-эргических нейронов, по-видимому, действуют путем стимуляции связывания GABA с ее рецептором.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Yamamura H. I., Enna S. J., Kuhar M. J. (eds.), *Neurotransmitter Receptor Binding*, 2nd edition, Raven Press, New York, 1985.
2. Karlin A., On the application of a 'plausible model' of allosteric proteins to the receptor for acetylcholine, *J. Theor. Biol.*, **16**, 306—320 (1967).
3. Nachmansohn D., *Harvey Lect.*, **49**, 57—99 (1955).
4. Belleau B., A molecular theory of drug action based on induced conformational perturbations of receptors, *J. Med. Chem.*, **7**, 776—784 (1964).
5. Changeux J.-P., The acetylcholine receptor: an 'allosteric' membrane protein, *Harvey Lect.*, **75**, 85—254 (1981).
6. Kehoe J., Three acetylcholine receptors in Aplysia neurons, *J. Physiol.*, **255**, 115—146 (1972).

7. Cuatrecasas P., Membrane receptors, *Ann. Rev. Biochem.*, **43**, 169—214 (1974).
8. Fambrough D. M., Control of acetylcholine receptors in skeletal muscle, *Phys. Rev.*, **59**, 165—227 (1979).
9. Pette D., Müller W., Leisner E., Vrbova G., Time dependent effects on contractile properties, fibre population, myosin light chains and enzymes of energy metabolism in intermittently and continuously stimulated fast twitch muscles of the rabbit, *Pflüger's Arch.*, **364**, 103—112 (1976).
10. Gordon A. S., Davis C. G., Milfay D., Diamond I., Phosphorylation of acetylcholine receptor by endogenous membrane protein kinase in receptor-enriched membranes of Torpedo californica, *Nature*, **267**, 539—540 (1977).
11. Birdsall N. J. M., Hulme E. C., Biochemical studies on muscarinic acetylcholine receptors, *J. Neurochem.*, **27**, 7—16 (1976).
12. Strosberg A. D., Vauquelin D., Durieu-Trautmann O., Delavier-Klutchki C., Bottari S., Andre C., Towards the chemical and functional characterization of the β -adrenergic receptor, *TIBS*, **5**, 11—15 (1980).
13. Greengard P., Possible role for cyclic nucleotides and phosphorylated membrane proteins in postsynaptic actions of neurotransmitters, *Nature*, **260**, 101—108 (1976).
14. Nestler E. J., Greengard P., Protein phosphorylation in the brain, *Nature*, **305**, 583—588 (1983).
15. Creese I., Burt D. R., Snyder S. H., Biochemical actions of neuroleptic drugs: focus on the dopamine receptor, *Handb. Psychopharmacol.*, **10**, 37—89 (1978).
16. Creese I., Sibley D. R., Hamblin M. W., Leff S. E., The classification of dopamine receptors: relationship to radioligand binding, *Ann. Rev. Neurosci.*, **6**, 43—71 (1983).
17. Stoof J. C., Kebabian J. W., Two dopamine receptors: Biochemistry, physiology and pharmacology, *Life Sci.*, **35**, 2281—2296 (1984).
18. Robson L. E., Paterson S. J., Kosterlitz H. W., Opiate receptors, In: *Handbook of Psychopharmacology*, Iversen L. L., Iversen S. D., Snyder S. H. (eds.), Vol. 17, p. 13—80, Plenum Press, New York, London, 1983.
19. Khachaturian H., Lewis M. E., Schäfer M. K. H., Watson S. J., Anatomy of the CNS opioid systems, *Trends Neurosci.*, **8**, 111—119 (1985).
20. Jessel T. M., Iversen L. L., Opiate analgesics inhibit substance P release from rat trigeminal nucleus, *Nature*, **268**, 549—551 (1977).
21. Lambert A., Nirenberg M., Klee W. A., Tolerance and dependence evoked by an endogenous opiate peptide, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 3165—3167 (1976).
22. Möhler H., Okada T., Biochemical identification of the site of action of benzodiazepines in human brain by 3H -diazepam binding, *Life Sci.*, **22**, 985—995 (1978).
23. Tallman J. F., Gallager D. W., The GABA ergic system: a locus of benzodiazepine action, *Ann. Rev. Neurosci.*, **8**, 21—44 (1985).
24. Braestrup C., Nielsen M., Benzodiazepine receptors. In: *Handbook of Psychopharmacology*, Iversen L. L., Iversen S. D., Snyder S. H. (eds.), Vol. 17, p. 285—384, Plenum Press, New York, London, 1983.
25. Lynch G., Baudry M., The biochemistry of memory: a new and specific hypothesis, *Science*, **224**, 1057—1063 (1984).
26. Shuster M. J., Camardo J. S., Siegelbaum S. A., Kandel E. R., Cyclic AMP-dependent protein kinase closes the serotonin-sensitive K^+ channels of Aplysia sensory neurons in cell-free membrane patches, *Nature*, **313**, 292—295 (1985).

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА

- Lamblé J. W. (ed.), *Towards Understanding Receptors*, 1981; *More about Receptors*, 1982; *Receptors Again*, 1984 (edited together with Abbot A. C.); Elsevier Science Publishers, Amsterdam, New York, Oxford.
- Yamamura H. I., Enna S. J., Kuhar M. J., (eds.), *Neurotransmitter Receptor Binding*, 2nd edition, Raven Press, New York, 1985.
- Lajtha A. (ed.), *Handbook of Neurochemistry*, 2nd edition, Vol. 6, Plenum Press, New York, London, 1984.
- Lajtha A., *Molecular neurobiology*, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 48, 1983.
- Strange P. (ed.), *Cell Surface Receptors*, Ellis Horwood Publishers, Chichester, 1983.
- Drachman D. B., The biology of myasthenia gravis, *Ann. Rev. Neurosci.*, 4, 195—226 (1981).
- См. также работы [5, 8, 13, 16, 18, 19, 23, 24] в разд. «Цитированная литература».

ЦИТОПЛАЗМА НЕЙРОНОВ
И НЕЙРОНСПЕЦИФИЧЕСКИЕ БЕЛКИ

В гл. 1 уже говорилось о том, что практически все функции нейронов в большей или меньшей степени обусловлены свойствами мембран. В частности, мембранную природу имеют такие явления как распространение нервных импульсов, их электрическая или химическая передача от клетки к клетке, активный транспорт ионов, клеточное узнавание и развитие синапса, взаимодействие с нейромодуляторами, нейрофармакологическими веществами и нейротоксинами. Такой, несколько односторонний взгляд уточняется в настоящей главе рассмотрением цитоплазмы нейронов. Хотя в основном она сходна с цитоплазмой других клеток — в ней обнаружены те же органеллы (а также синаптические везикулы) и ферменты (и, кроме того, участвующие в метаболизме медиаторы), однако нейрональная цитоплазма адаптирована специфическим образом именно к функциям нейронов.

Аксональный транспорт — внутриклеточная система коммуникации

Ранее мы определили нервную систему как орган коммуникации, а нейрон — как ее элементарную единицу. Нейроны обеспечивают связь, или сообщение, между отдельными участками организма, часто значительно удаленными друг от друга (эти расстояния измеряются в сантиметрах, но могут составлять несколько метров, если речь идет о жирафах и китах!). Это означает, что пассивной диффузии недостаточно, чтобы молекулы преодолели за разумное время довольно значительное расстояние от тела клетки до нервного окончания. Как же тогда ядро клетки регулирует действия, например, кончика растущего аксона? Более 30 лет назад Пауль Вейс, основатель биологии развития нервной системы, нашел ответ на этот вопрос: аксон имеет собственную систему транспорта макромолекул и молекул меньшего размера. Такой «аксональный транспорт» [1] складывается из *антероградного* (в направлении от тела клетки к нервному окончанию) и *ретроградного* (от окончания аксона к телу клетки) транспорта. Существует также транссинаптический транспорт от нейрона к нейрону, от глиальной

клетки к нейрону (и в обратных направлениях), но об этих процессах пока еще мало что известно. Транспорт в цитоплазме нейронов не является уникальным свойством нейрона, он аналогичен внутриклеточному транспорту в других клетках. Однако специфическая форма нервных клеток делает их особенно удобными объектами его исследования.

Были разработаны два основных метода изучения транспорта: пережимание (лигатура) аксона и радиоактивное мечение. Первый метод был разработан Вейсом, который демонстрировал транспорт при лигатуре, или пережимании, аксонов (рис. 10.1). При этом все, что переносится в прямом направлении задерживается на проксимальном участке (ближайшем к телу клетки), продукты обратного транспорта накапливаются в дистальной области (ближе к синапсу), т. е. на дистальных участках образуется дефицит продуктов прямого транспорта, а в проксимальной (центральной) области аксона — продуктов обратного транспорта. В дальнейшем вместо лигатуры стали использовать локальное охлаждение аксона. Такая методика обеспечивает меньшее повреждение ткани и позволяет вернуться к исходному состоянию нервного волокна.

Метод радиоактивного мечения требует введения экспериментальным животным в область клеточных тел определенных нервных путей радиоактивных предшественников. Так, после инъекции в глаз можно следить за меткой по мере ее прохождения по зрительному пути. Более полная информация может быть получена путем определения распределения радиоактивной метки в зависимости от времени в разрезанном на равные сегменты нерве. Такие определения можно проводить в сочетании с лигатурой или с исследованиями цитоплазмы нервных окончаний при использовании субклеточного фракционирования для их выделения в виде синапсом.

Измерение распределения радиоактивности в нерве за различные промежутки времени позволяет изучить кинетику транспорта (рис. 10.2). Если затем провести электрофоретический анализ отдельных сегментов в ДСН-полиакриламидном геле, то можно идентифицировать транспортируемые радиоактивные компоненты.

Для проведения исследований зрительного пути особенно удобны рыбы и птицы (рис. 10.1, а), так как у них весь оптический нерв локализован в противоположной половине мозга (у млекопитающих он разделяется на правое и левое зрительные поля). Идеальными системами исследования являются также обонятельные нервы некоторых рыб (длиннорылый панцирник, щука), а у млекопитающих особенно полезны в этом отношении дорсальные корешки седалищного нерва кошки (рис. 10.2).

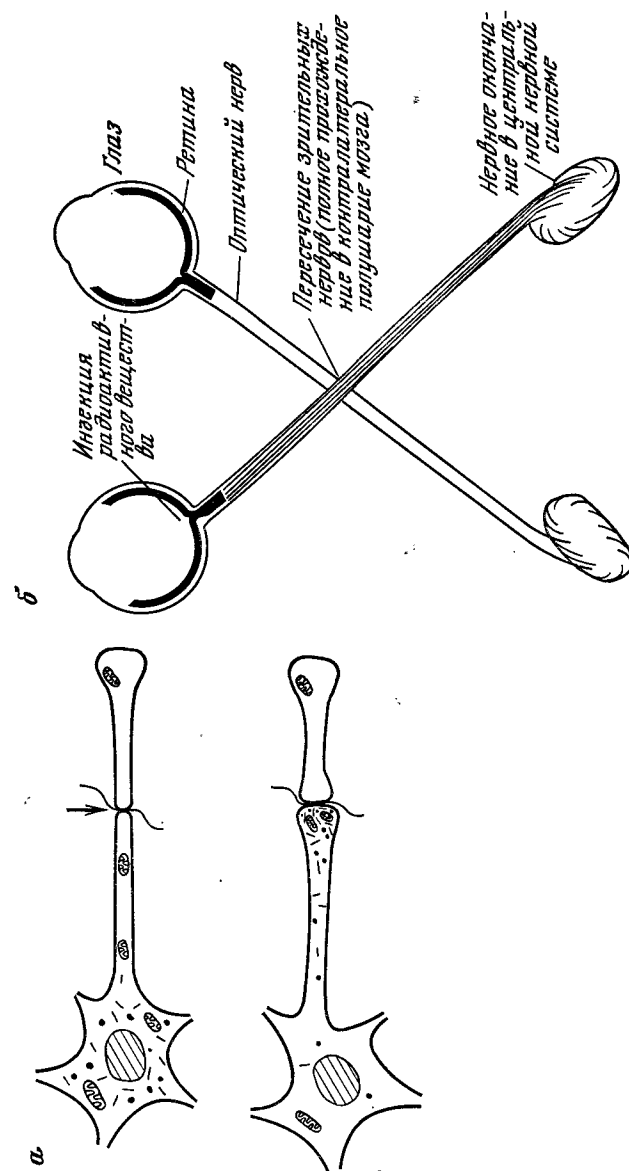


Рис. 10.1. Аксональный транспорт. а — лигатура аксона; б — участок-мишень нерва (оптическая система птицы).

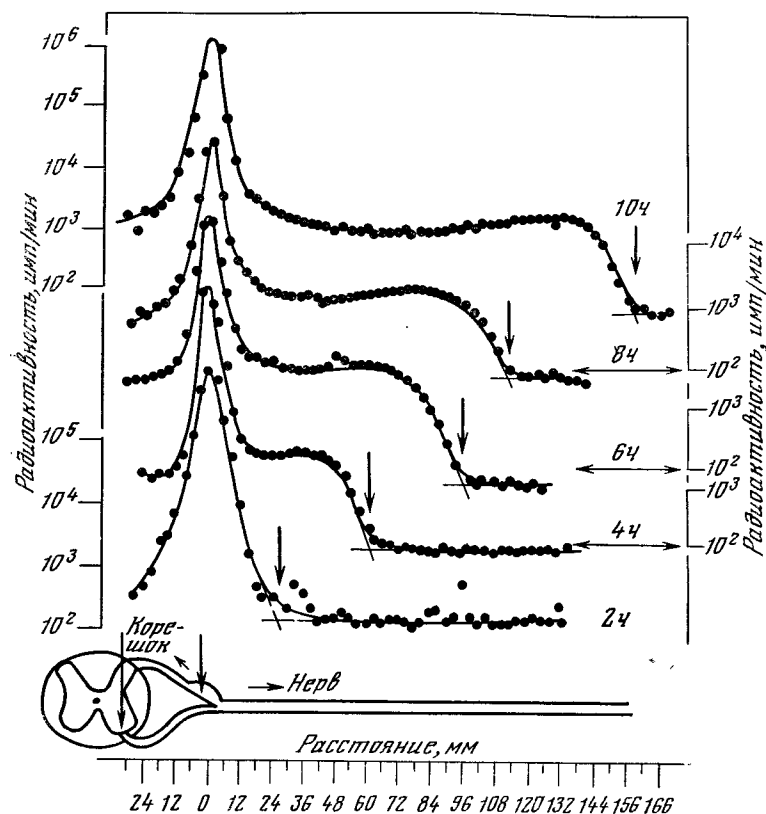


Рис. 10.2. Аксональный транспорт. Измерения распределения радиоактивности в различные моменты времени после инъекции радиоактивно меченной аминокислоты в дорсальный корешок спинного мозга. За 10 ч радиоактивная метка прошла путь ~160 мм вдоль седалищного нерва (быстрый транспорт). (Воспроизводится с разрешения *Ochs* и American Association for the Advancement of Science.) [Science, 176, 253 (1972)].

Транспортируются все компоненты нервной клетки: белки, липиды, медиаторы, митохондрии и другие

Синтез белков происходит почти исключительно в теле клетки, поэтому белки аксональной и пресинаптической мембран и особенно ферменты метаболизма и синтеза медиаторов переносятся антероградным транспортом. Однако синтез медиаторов происходит не только в нервном окончании, но и в теле клетки, следовательно ацетилхолин, катехоламины и GABA также транспортируются. Вопрос о синтезе белка в нервном окончании (транспорт рибосом) обсуждался довольно долго. Сейчас уже ясно,

что по аксону переносятся целые митохондрии и что наблюдаемый белковый синтез осуществляется в митохондриях. Молекулы фосфолипидов, гликолипидов и гликопротеинов также могут транспортироваться. Если радиоактивно меченная фукоза, компонент углеводных цепей многих гликопротеинов, вводится в тело клетки, то она включается в белок в цитоплазме, а не в нервном окончании. В то же время N-ацетилнейраминовая кислота (NANA) ведет себя по-другому: она, видимо, встраивается в гликопротеин или гликолипид только в нервном окончании.

Кинетика транспорта: скорости различных компонентов различны

Обнаружены заметные различия в скоростях транспорта. Первоначально различали только медленный аксональный транспорт («аксональный поток»), имеющий скорость 1—4 мм/сут, и быстрый — 200—400 мм/сут. Впоследствии выявлена еще одна скорость переноса 15—50 мм/сут, а в некоторых работах [2] предполагается существование даже пяти скоростей. Здесь важно отметить, что идентичные молекулы транспортируются с одинаковой скоростью. Аксональный поток (медленный аксональный транспорт) переносит следующие белки (некоторые далее подробно рассмотрены): тубулин, субъединицы нейрофиламентов, актин, миозин и белки типа миозина, а также растворимые ферменты промежуточного метаболизма. Если аксон отделить от тела клетки, медленный транспорт прекращается. Ретроградный медленный транспорт не наблюдался. Митохондрии «путешествуют» с промежуточной скоростью, а ферменты метаболизма медиаторов (например, допамин-β-гидроксилаза и ацетилхолинэстераза), гликопротеины и гликолипиды, — с высокой скоростью. Ацетилхолинэстераза переносится и в обратном направлении с примерно такой же высокой скоростью.

Механизм: энергозависимый, связанный с мембранами и осуществляемый филаментными структурами

Аксонплазма представляет собой гелеподобную массу, что делает невозможной обычную диффузию макромолекул с вышеуказанными скоростями. Еще один довод против пассивного транспорта заключается в том, что разобщители окислительного фосфорилирования блокируют транспорт. 2,4-Динитрофенол, цианиды и азиды ингибируют его так же, как фторид ингибирует гликолиз. Для транспорта необходимы кислород и АТФ. Быстрый аксональный транспорт не связан с телом клетки и наблюдается в изолированных аксонах в растворе Рингера, а также в бессолевых растворах сахарозы. Электровозбудимость и блокирование потенциалов действия тетродотоксином не влияют на

транспорт. Блокаторы белкового синтеза не ингибируют быстрый транспорт; однако при низких температурах он нарушается.

Колхицин, (рис. 10.3), алкалоид из безвременника осеннего (*Colchicum autumnale*), является мощным ингибитором аксонального транспорта. Этот яд — важный инструмент в изучении механизма транспорта. Под действием колхицина, классического ингибитора митоза, происходит диссоциация филаментов веретенового аппарата. Аксоплазма переплетена многочисленными филаментными структурами, построенными в основном из белка и обуславливающими гелеобразную консистенцию. Различают три типа филаментов: *микротрубочки*, *микрофиламенты* (и те, и другие присутствуют не только в нервных клетках) и *нейрофиламенты*, характерные для нейронов и глиальных клеток.

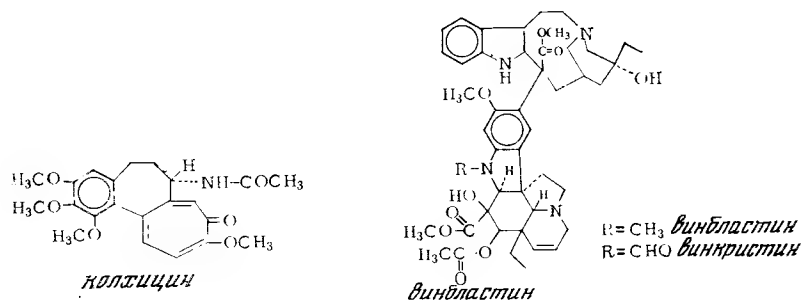


Рис. 10.3. Ингибиторы аксонального транспорта: алкалоиды, колхицин (*Colchicum*) и винбластин (*Vinca*), которые также ингибируют митоз вследствие их диссоциирующего действия на микротрубочки митотического веретена.

Микротрубочки представляют собой полые трубки (диаметр 24 нм), нейрофиламенты и микрофиламенты — волокна (диаметр 10 и 8 нм). Микротрубочки, построенные из тубулина, в присутствии алкалоидов колхицина и винбластина диссоциируют на субъединицы. Имеются многочисленные примеры того, что этот процесс проходит параллельно с ингибированием аксонального транспорта, но прямая причинная зависимость еще не доказана. Так были описаны случаи ингибирования транспорта колхицином без разрушения микротрубочек. Действие колхицина может не ограничиваться изменением состояния агрегации тубулина.

Для объяснения механизма аксонального транспорта выдвинуты многочисленные гипотезы, и, как уже упоминалось в этой книге, здесь необходимы дополнительные исследования, пока же приходится довольствоваться вопросами и предположениями. Упакованы ли транспортируемые компоненты в везикулы или они попадают в аксон в растворимом виде? Есть данные в поль-

зу везикулярной гипотезы. Так, белки, участвующие в быстром транспорте, ассоциированы с мембранными компонентами: с помощью электронной микроскопии можно убедиться, что мембранные органеллы существуют и транспортируются. Нечто похожее происходит при секреции — вещество переносится к месту секреции в упакованном виде (этот процесс также может блокироваться колхицином).

Еще один важный вопрос: имеется ли селективность или специфичность в отношении веществ, которые транспортируются, или любая молекула передается по аксону? Показано, что определенная степень специфичности имеет место: ацетилхолин при введении в цитоплазму не транспортируется в адренэргических нейронах, а холинэргические нейроны не проводят серотонин. Однако более вероятно, что такая селективность обусловлена не механизмом транспорта, а самими везикулами, содержащими медиатор, и это является еще одним аргументом в пользу везикулярного транспорта. То же самое приложимо к транспорту ферментов; допамин-β-гидроксилаза специфически переносится катехоламинэргическими нейронами, потому что она способна встраиваться в катехоламинэргические везикулы. За исключением вышеперечисленных фактов в разных нейронах существенных различий в транспорте не обнаружено. Это касается и ретроградного транспорта; здесь также селективность механизма функционирования пресинаптической мембраны определяет специфичность транспорта. Адренэргические нейроны переносят только фактор роста нерва (NGF) в ретроградном направлении, а в этом же направлении проходят нейротропические вирусы (*polyomyelitis*, *herpes*), так как для них имеется центр связывания и система поглощения в нервном окончании.

Третий вопрос связан с двумя предыдущими и касается роли эндоплазматического ретикулаума в транспорте. Он, вероятно, образует систему непрерывных каналов вдоль всего аксона, поскольку радиоактивные молекулы в процессе транспорта концентрируются здесь особенно быстро. Эти каналы могут составить идеальную транспортную систему, но, даже если бы имелось доказательство их существования, оно само по себе не проясняет природу механизма транспорта. Как они взаимодействуют с микротрубочками, микро- и нейрофиламентами и актином? Здесь мы не имеем возможности обсуждать разнообразные выдвигаемые гипотезы. Общее мнение заключается в том, что транспортирующая активность зависит от ионов кальция и обусловлена системой актин — миозин, работа которой подобна механизму мышечного сокращения. По-видимому, наиболее вероятна модель, предложенная Дрозом — сторонником ретикулярной гипотезы (рис. 10.4), поскольку она учитывает большую часть известных фактов [3].

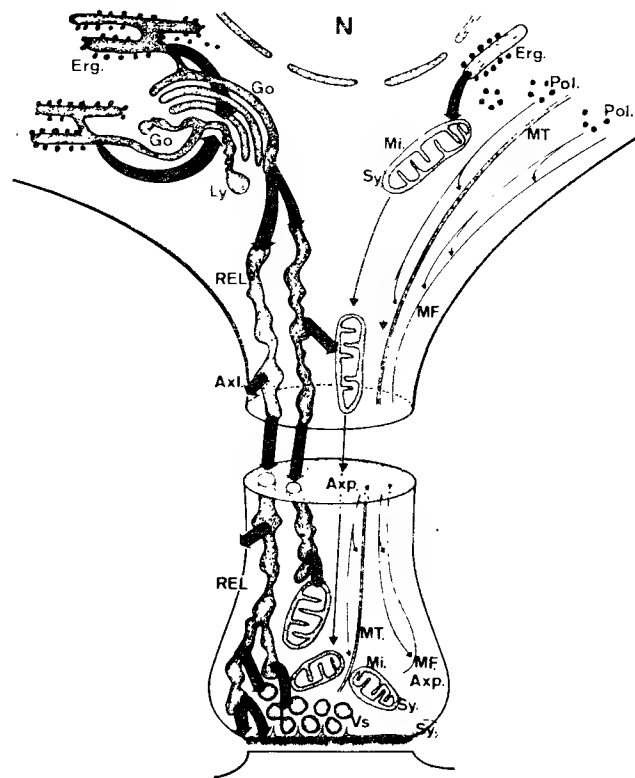


Рис. 10.4. Модель аксонального транспорта [3]. N — ядро; Mi — митохондрия; REL — гранулярный эндоплазматический ретикулум; SER — гладкий эндоплазматический ретикулум; Go — аппарат Гольджи; Ly — лизосома; Axl — аксолема; Axp — аксоплазма; Pol — полирибосома; MT — микротрубочки; MF — микрофиламенты; Sy — место синтеза гидрофобных полипептидов; Vs — синаптическая везикула. (Подробности см. в работе [3].)

На рис. 10.4 схематически показан путь, который проходит белок, синтезированный в перикарионе, из гранулярного эндоплазматического ретикулума в аппарат Гольджи, а оттуда через гладкий эндоплазматический ретикулум к нервному окончанию. Справа обозначен медленный аксональный поток, т. е. синтез компонентов структур трубочек и филаментов, их соединение и транспорт.

Тубулин и ассоциированные с ним белки

Биохимики чувствуют себя увереннее при описании структур, а не механизмов. Некоторые аксоплазматические белки были хорошо изучены и мы коротко расскажем о них.

Тубулин может быть выделен из мозга в виде димерного белка с $M 110\,000$ и коэффициентом седиментации $S_{20,w} \delta S$ [4]. Он состоит из двух идентичных субъединиц: α ($M 53\,000$) и β ($M 57\,000$); их аминокислотные последовательности в значительной степени гомологичны, что указывает на дупликацию гена в ходе эволюции. Микротрубочки — полимеры тубулина. Тринадцать линейных «протофиламентов» субъединиц тубулина составляют структуру трубочки, так что поперечное сечение имеет ось симметрии 13-го порядка, а вид сбоку представляет упакованные по спирали субъединицы (рис. 10.5). Процессы ассоциации отдельных молекул тубулина и диссоциации микротрубочек находятся в равновесии, на которое влияют различные параметры (температура, концентрации Ca^{2+} и GTP, фосфорилирование). Очень чистый тубулин образует микротрубочки только в условиях высокой концентрации белка и магния. В клетке действуют и другие факторы, видимо, влияющие на

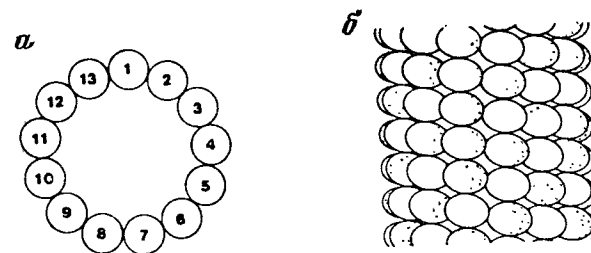


Рис. 10.5. Микротрубочки. а — поперечное сечение с осью симметрии 13-го порядка; на электронной микрофотографии α - и β -субъединицы тубулина не различимы (предполагается, что они чередуются); б — вид сбоку; протофиламенты, т. е. вертикальные ряды молекул тубулина; спиральное расположение одной субъединицы относительно другой [4].

ассоциацию. В частности, при физиологических условиях ассоциации способствуют специфические белки, связанные с микротрубочками (сокращение от англ. microtubule-associated protein — MAP) [5], и белок сборки тубулина (tubulin assembly protein — TAP или Т-фактор), которые трудно отделить при очистке тубулина. Кроме того, димерная молекула тубулина содержит два GTP-связывающих центра. Ассоциация с образованием трубчатой структуры сопровождается гидролизом GTP до GDP благодаря GTPазной активности тубулина. Более легкая диссоциация комплекса GDP — тубулин указывает на важную роль этой реакции; GTP и GDP, видимо, индуцируют различные конформации тубулина, причем GTP-форма легче ассоциирует, а GDP-форма легче диссоциирует. Менее ясна роль cAMP-зависимой киназы и Ca^{2+} -кальмодулинзависимой киназы (см. ниже), которые фосфорилируют α - и β -субъединицы тубулина по остат-

кам серина. Предполагается, что эти ковалентные модификации влияют на равновесие ассоциации — диссоциации.

Большое количество эффекторов свидетельствует о сложной регуляции образования микротрубочек в клетке. Ассоциация, видимо, начинается в одной точке клетки и идет в одном направлении при добавлении мономеров к удлиняющемуся или «головному» концу полимера, тогда как на «хвостовом» конце преобладает диссоциация. Вероятно, сумма этих векторных процессов обуславливает наблюдаемый медленный аксональный поток тубулина.

Регуляция ассоциации тубулина играет важную роль при регенерации поврежденных нейронов и при росте нейритов на ранних стадиях развития нейрона. Микротрубочки вначале формируются очень медленно, хотя на ранних стадиях дифференциации в клетке уже имеется достаточное количество тубулина. Дальнейшая дифференциация характеризуется интенсивным ростом нейритов и возрастающей скоростью сборки тубулина, что сопровождается характерными изменениями MAP.

Нейрофиламенты

Мы уже упоминали, что в аксоплазме имеются такие филаментные структуры как нейрофиламенты. Диаметр этих структур 10 нм, они располагаются между нейротрубочками (диаметр 24 нм) и филаментами актина (диаметр 6 нм). Поэтому нейрофиламенты составляют класс *промежуточных филаментов* [6], которые были найдены в различных клетках и к которым принадлежат кератиновые филаменты эпителиальных клеток, глиальные филаменты и десминовые филаменты клеток мышц. Их функциональная роль заключается в создании своеобразного клеточного скелета. В электронном микроскопе видны разветвления волокон. Нейрофиламенты из нерва кролика состоят из трех белков с 68 000, 150 000 и 200 000. До сих пор только два белка нейрофиламентов с M 200 000 и 60 000 были выделены из гигантского аксона кальмара [7]. Они чувствительны к действию Ca^{2+} -зависимой протеазы и поэтому их нелегко получить в интактном состоянии. Все белки нейрофиламентов фосфорилируются cAMP-зависимой киназой.

Актин, миозин: их роль в механической работе?

Сократительные белки актин и миозин найдены во всех нейронах. Высокая концентрация актина позволяет предположить его непосредственное участие в аксоплазматическом транспорте; однако пока нет четких свидетельств в пользу этой весьма вероятной гипотезы.

Кальмодулин — медиатор кальциевой регуляции

Аксоплазматический транспорт является Ca^{2+} -зависимым процессом. В нейронах, как, видимо, и в клетках других типов, найден белок, который участвует во многих процессах, регулируемых ионами кальция. Этот белок получил название кальмодулин [8]. Кальмодулин — очень устойчивый белок с M 17 000, содержащий четыре Ca^{2+} -связывающих центра в полипептидной цепи (рис. 10.6); его аминокислотная последовательность

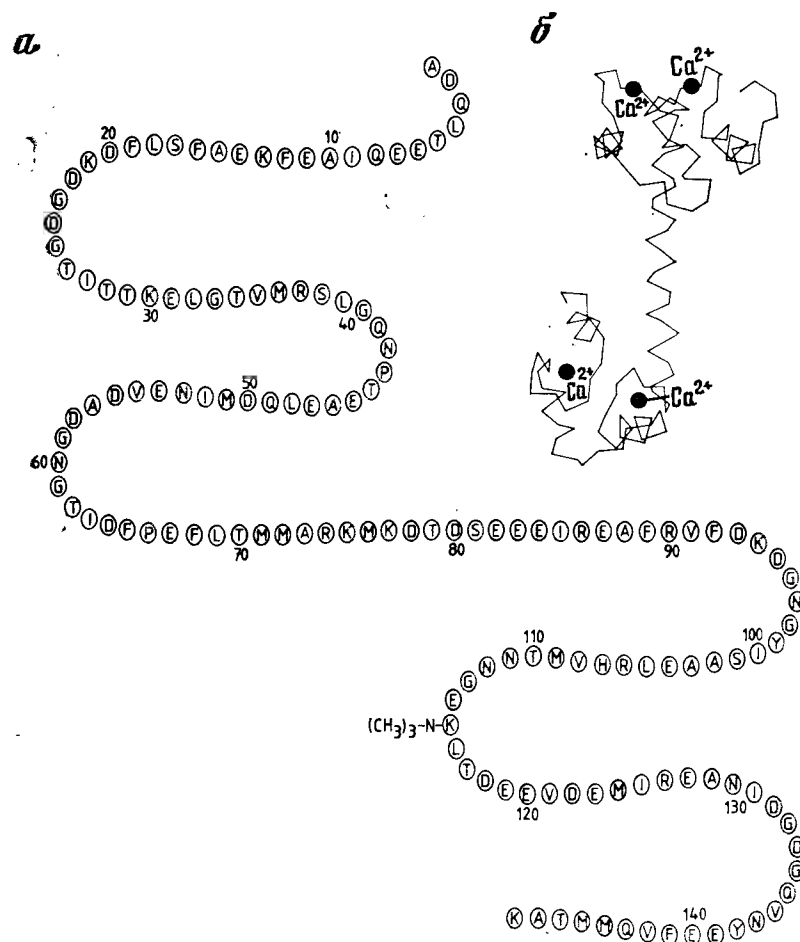


Рис. 10.6. Кальмодулин. Молекула содержит четыре Ca^{2+} -связывающих домена. а — первичная структура; б — третичная структура [Babu et al., Nature, 315, 37—40 (1985)].

характеризуется присутствием редкой аминокислоты триметилина.

Ca^{2+} -кальмодулин выполняет регуляторные функции либо непосредственно как аллостерический регулятор отдельных белков, либо опосредованно через действие на Ca^{2+} -кальмодулинзависимые протеинкиназы, которых особенно много в мозге (0,3% общего белка мозга). Наличие кальмодулина легко может быть подтверждено биохимическим анализом с использованием нейрорепрессивных препаратов, например хлорпромазина, который ингибирует действие Ca^{2+} , опосредованное кальмодулином. Целый ряд лекарств, включая некоторые местные анестетики, действуют аналогичным образом. При их применении в медицине остается неясным, сопровождается ли их терапевтическое действие побочными эффектами в нервной системе, а также там, где Ca^{2+} -кальмодулин играет основную роль *in vivo*.

В свою очередь кальмодулин может регулироваться другими белками, среди них особенно интересен белок, называемый *кальцинейрином*. Кальцинейрин с высоким сродством взаимодействует с кальмодулином и, таким образом, ингибирует его регуляторную функцию. Он содержит четыре Ca^{2+} -связывающих центра на молекулу и состоит из двух субъединиц, Ca^{2+} -зависимого кальцинейрина А (M 61 000), взаимодействующего с кальмодулином, и кальцинейрина В (M 15 000), также содержащего Ca^{2+} -связывающие центры. Недавно было обнаружено, что кальцинейрин обладает фосфопротеинфосфатазной активностью [9]. Очевидно, он идентичен так называемой фосфопротеинфосфатазе 2В, найденной в больших количествах в нервной ткани, но присутствующей и в других органах.

Сборка тубулина ингибируется ионами кальция при участии кальмодулина. Далее, кальмодулин играет специфическую роль при регуляции секреции нейромедиатора из нервного окончания — это также Ca^{2+} -зависимый процесс (гл. 8). Очень высокая концентрация кальмодулина в мозге (10 мкмоль/л), а также необычно высокая консервативность аминокислотной последовательности при эволюции указывают на значимость этого белка. Кроме участия в функционировании нейронов, кальмодулин работает как медиатор кальциевой регуляции аденилатциклазы, фосфодиэстеразы, фосфоорилазы, киназы и фосфорилирования многочисленных мембранных белков.

Нейронспецифические белки

Имеется целый ряд белков с еще неизвестной функцией, которые играют особую роль в цитоплазме или мембранах нервных клеток. Нейронспецифические белки могут быть рецепторами,

компонентами ионных каналов и нейрофиламентами, уже описанными в этой и предыдущих главах. Кроме того, следует отметить некоторые ферменты метаболизма нейромедиаторов, миелиновые белки, синаптические белки (например, белок «постсинаптической плотности») и белки, связывающие нейротоксины, такие, как β -бунгаротоксин, ботулинический и столбнячный токсины. Здесь же заслуживает упоминания и синапсин (гл. 9).

Белок S-100 специфичен для нервной системы [10]. Он широко представлен как в нейронах, так и в глиальных клетках и охарактеризован как цитоплазматический и мембранно-связанный белок; M 20 000; он состоит из двух Ca^{2+} -связывающих полипептидных цепей. Видимо, S-100 принадлежит к группе сходных белков, для одного из которых, РАР Ib-белок (сокращение для *кислого белка богатого фенилаланином*), недавно была определена первичная структура [11]. S-100 имеет значительную структурную гомологию с Ca^{2+} -связывающим мышечным белком тропонином С. Функция S-100 не выяснена; в гл. 11 мы вернемся к его возможному участию в развитии нервной системы и пластичности.

Белок 14-3-2 имеется, видимо, только в нейронах центральной нервной системы [10]. Это — димер, состоящий из двух полипептидных цепей с M 39 000; его обнаруживают с помощью иммунофлуоресценции у млекопитающих и птиц. Функция этого белка неизвестна; однако недавно была обнаружена энолазная активность в его высокоочищенных препаратах.

Белок Р-400 был найден в мозжечке, а не в коре головного мозга мышей, он отвечает за двигательный контроль; M 400 000; он не обнаружен у мутантов мыши с нарушениями нервной системы (гл. 12).

Поиск нейронспецифических белков, связанных с генетическими нервными заболеваниями, очень сложен, однако перспективен. Примером является белок РсI Duarte (специфический белок мозга), наличие которого связывают с заболеванием шизофренией [12]. Все возрастающее число специфических компонентов нервной системы открывают с помощью иммунологических методов. Так как их функция неизвестна, они обозначаются символами: NS1, NS2, L1 и т. д. (NS — *антиген нервной системы*). Применение техники моноклональных антител ведет к открытию антигенов клеточной поверхности, специфичных для различных типов клеток нервной системы. Таким способом обнаружен фактор адгезии нейрональных клеток (N-CAM), который, по-видимому, играет важную роль в развитии нервной системы [13]. Мы вернемся к этому в следующей главе. Установлено, что мозг экспрессирует ~30 000 генов, продукты которых все еще ждут исследования.

Выводы

Цитоплазма нейрона находится в постоянном движении. Это движение, называемое аксональным транспортом, осуществляет функциональную связь между телом клетки и ее ядром, с одной стороны, и нервным окончанием, с другой стороны, часто находящимся на расстоянии 1 м и даже более. Аксональный транспорт обуславливает рост и функциональную активность аксона, его регенерацию после очаговых поражений и адаптацию синаптической активности. Различают антеро- и ретроградный аксональный транспорт, так что различные компоненты могут проходить не только от тела клетки к синапсу, но и в обратном направлении. Существует медленный аксональный поток (1—4 мм/сут), промежуточный (15—50 мм/сут) и быстрый (200—400 мм/сут). Каждый вид молекул переносится с характерной для него скоростью. Тубулин, субъединицы нейрофиламентов, актин и миозин транспортируются медленно; митохондрии с промежуточной скоростью; мембранные белки, гликопротеины, гликолипиды, ферменты синтеза медиаторов и медиаторы — быстро. ДНК, РНК и ганглиозиды не транспортируются. Ретроградный транспорт удаляет продукты деградации синапсов, переносит ферменты, а также субстраты, поглощенные пресинаптической мембраной, например фактор роста нервов, токсин столбняка и нейротропные вирусы.

Существование аксонального транспорта было подтверждено опытами по лигатуре аксонов, анализом рецептирующей области (например, оптического мостика для транспорта из клеток ретины) и опытами по распределению предшественника радиоактивного белка, введенного в область, богатую нейронными перикарионами, например ганглий дорсального корешка.

Для транспорта необходимы энергия, кальций и микротрубочки. Последние состоят из тубулина, ассоциация которого регулируется сложным образом белками MAP, TAP, GTP, Ca^{2+} , кальмодулином, фосфорилированием и другими факторами. Колхицин ингибирует сборку микротрубочек и аксональный транспорт. Микротрубочки, микрофиламенты и нейрофиламенты переплетаются с актин-миозиновым комплексом аксоплазмы и придают ей желеобразную консистенцию. Кроме того, цитоплазма нейронов содержит наряду с другими компонентами ферменты метаболизма посредников и медиаторов, а также особые эффекторные белки, например кальмодулин, который опосредует регуляторное действие Ca^{2+} при метаболизме, высвобождении медиаторов и т. д. В цитоплазме присутствуют кальцинейрин и целый ряд нейронспецифических белков — белок 14-3-2, белок S-100 (содержащийся также в глиии), белок P-400 (в мозжечке). В нейрональной мембране идентифицированы нейронспецифиче-

ские поверхностные антигены (NS1, NS2, L1) с неизвестной пока функцией и факторы адгезии клеток (N-CAM), важные для развития нервной системы. Мозг экспрессирует ~30 000 генов. Многие продукты этих генов могут быть специфичны только для мозга, но они пока не идентифицированы [14].

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Schwartz J. H., Axonal transport: components, mechanisms, and specificity, *Ann. Rev. Neurosci.*, **2**, 467—504 (1980).
2. Lasek R., Axonal transport: a dynamic view of neuronal structures, *TINS*, **3**, 87—91 (1980).
3. Droz B., Synthetic machinery and axoplasmic transport: maintenance of neuronal connectivity. In: *The Nervous System*, D. B., Tower (ed.), Vol. 1, p. 111—127, Raven Press, New York, 1975.
4. Snyder J. A., McIntosh J. R., Biochemistry and physiology of microtubules, *Ann. Rev. Biochem.*, **45**, 699—720 (1976).
5. Mareck A., Fellous A., Francon J., Nunez J., Changes in composition and activity of microtubule-associated proteins during brain development, *Nature*, **284**, 353—335 (1980).
6. Lazarides E., Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space, *Nature*, **283**, 249—256 (1980).
7. Roslansky P. F., Cornell-Bell A., Rice R. V., Adelman W. J., Polypeptide composition of squid neurofilaments, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 404—408 (1980).
8. Klee C. B., Crouch T. H., Richmann P. G., Calmodulin, *Ann. Rev. Biochem.*, **49**, 489—515 (1980).
9. Stewart A. A., Ingebritsen T. S., Manalan A., Klee C. B., Cohen P., Calcineurin, *FEBS Lett.*, **137**, 80—84 (1982).
10. Bock E., Nervous system specific proteins, *J. Neurochem.*, **30**, 7—14 (1978).
11. Isobe T., Okuyama T., The amino-acid sequence of S-100 protein (PAP I-b protein) and its relation to calcium-binding proteins, *Eur. J. Biochem.*, **89**, 379—388 (1978).
12. Comings D. E., PC I Duarte, a common polymorphism of human brain protein, and its relationship to depressive disease and multiple sclerosis, *Nature*, **77**, 28—32 (1979).
13. Edelman G., Cell adhesion molecules, *Science*, **219**, 452—457 (1983).
14. Sutcliffe J. G., Milner R. J., Brain specific gene expression, *TIBS*, **9**, 95—99 (1984).

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА

- Weiss D. G. (ed.), *Axoplasmic Transport*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1982.
- Forman D. S., New approaches to the study of the mechanism of fast axonal transport, *TINS*, **7**, 112—116 (1984).
- Bray D., Gilbert D., Cytoskeletal elements in neurons, *Ann. Rev. Neurosci.*, **4**, 505—523 (1981).
- См. также работы [2, 6, 8, 13, 14] в разд. «Цитированная литература».

РАЗВИТИЕ, СТАБИЛИЗАЦИЯ И ПЛАСТИЧНОСТЬ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

Зрелая нервная система человека состоит из более, чем 10^{10} нервных клеток, каждая из которых образует синаптические контакты с 10^4 других нервных клеток. В гл. I мы определили функцию нервной системы как накопление, обработку, хранение и передачу информации через синаптические связи клеток (т. е. особую систему коммуникации нейрональных клеток), а не путем ее кодирования в определенных клетках с помощью набора импульсов. Одним из главных вопросов нейробиологии является происхождение механизма такой системы коммуникации при онтогенезе нервной системы.

Совершенно очевидно, что эту проблему следует рассматривать в контексте более общего вопроса о механизме клеточной дифференциации. Оплодотворенное яйцо, как и любая другая клетка зрелого организма (за исключением эритроцитов), имеет полный набор хромосом, содержащих ДНК — соединение, ответственное за передачу наследственной информации. Дифференциация клетки означает подавление большей части этой информации и создание благоприятных условий для реализации информации, необходимой для создания специализированной клетки данного состава и с данной функцией. Сегодня молекулярная биология все еще далека от понимания молекулярного механизма дифференциации.

У позвоночных эмбриональное развитие нервной системы начинается на стадии гастролы с образования клеточного агрегата, называемого *нервной пластинкой*. Мы не имеем здесь возможности описать подробно последующие стадии развития нейрона. Мы можем здесь говорить только о двух терминах — о *миграции* и *росте*. Развивающийся нейрон мигрирует через многочисленные клеточные слои растущего организма к области-мишени, где и интегрируется как часть зрелого органа.

В настоящее время нет данных о наличии специфической распознающей метки, с помощью которой мигрирующая клетка находит нужный ей участок развивающейся ткани. Наоборот, по-видимому, в клетке имеется ограниченное число факторов адгезии — веществ, которые являются посредниками клеточной адгезии и закрепляют мигрирующие клетки в нужном участке.

Лучше всего охарактеризован фактор адгезии нейронов (N-CAM), открытый Эделманом. Имеется также фактор адгезии нейроглии (Ng-CAM) — посредник при адгезии нейронов и клеток глии. N-CAM — большой гликопротеин ($M\ 200\ 000$) с высоким содержанием сиаловой (N-ацетилнейраминавой) кислоты. В процессе развития происходят динамические изменения в содержании, распределении и углеводном составе N-CAM. Углеводный состав, особенно содержание сиаловой кислоты, видимо, определяет сродство к поверхности клетки.

Нейрон также *растет* путем удлинения дендритов и аксона. Часто аксон покрывает большие расстояния, чтобы достичь места своего назначения.

Созревание нейрона и, следовательно, превращение в дифференцированную клетку зависит от следующих факторов: 1) (*сколько?*) количества экспрессируемой ДНК; 2) (*как долго?*) времени этой экспрессии; 3) (*где?*) участка, на котором происходит экспрессия.

Фактор «как долго?» может определяться самопроизвольно с помощью молекулярного механизма транскрипции и трансляции ДНК; для нас же особый интерес представляют факторы «сколько?» и «где?». Если сайт (т. е. клеточное окружение развивающейся клетки на пути от нервной пластинки к специализированному органу-мишени) влияет на экспрессию гена, то это предполагает ограничение генетической детерминированности организма. В самом деле, имеются доказательства того, что клетки влияют друг на друга в период развития. Это происходит либо при прямом контакте, молекулярный механизм которого не вполне ясен, либо при выделении химических сигналов, называемых факторами роста нервов. Последние мы будем обсуждать в связи с термином *трофизм*, а механизм прямого контакта будет показан на примере образования и стабилизации синапсов. Следует отметить, что не только генетическая программа определяет окончательную структуру нейрональной сети, существенно также положение отдельной клетки в пространстве и времени. Именно последнее и помогло сделать следующий вывод: геном человека содержит $>10^6$ генов, а число синапсов $>10^{14}$ (10^{10} нейронов, каждый из которых имеет 10^4 синапсов, см. выше), так что маловероятно (хотя и нельзя считать совсем невозможным вследствие огромного разнообразия антител, продуцируемых ограниченным числом генов), чтобы специфичность каждого отдельного синапса программировалась определенным участком гена. Мы еще вернемся к этому важному вопросу при рассмотрении синаптогенеза, т. е. процесса образования и стабилизации специфических синапсов. Представляется вполне допустимым, что развитие нервной системы контролируется несколькими факторами: генетическим, трофи-

ческим и еще одним, решающим, как мы еще увидим, — активностью нейрона.

В ходе развития (рис. 11.1) клетка анализирует множество альтернативных путей роста и, следовательно, перебирает много решений. Клетки матрикса, например, могут развиваться либо в глиобласты, либо в нейробласты. Глиобласты затем дифференцируют в различные типы глиальных клеток, а некоторые из них получают сигнал к дифференциации до миелина. Дифференциация нейробластов сопровождается появлением таких функций нервной клетки, как электровозбудимость, синтез нейромедиаторов и образования синапсов. Биохимические механизмы, лежащие в основе этих стадий дифференциации, в основном неизвестны, но уже имеется целый ряд исследований в этом направлении. При этом исключительно ценной из-за относительной простоты и гомогенности оказалась автономная нервная системы [1]. После ее рассмотрения мы перейдем к последним биохимическим исследованиям дифференциации нерв-

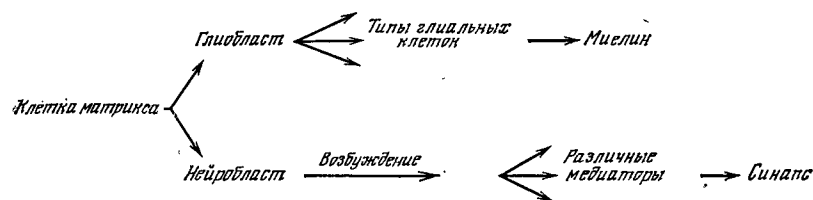


Рис. 11.1. Пути дифференциации нервных клеток.

ных клеток, к клеточной культуре [2] и, наконец, к некоторым результатам, полученным при изучении других участков нервной системы.

Дифференциация нейромедиаторов

Большинство нервных клеток зрелой нервной системы используют только один нейромедиатор и поэтому располагают механизмами его синтеза, хранения и высвобождения. Недавно было показано, что в отдельных нейронах *Aplysia* присутствуют несколько нейромедиаторов и функционирует несколько ферментных систем, необходимых для их синтеза, а в адренэргических нейронах млекопитающих — несколько нейропептидов. При этом постулируется, однако, что на определенной стадии созревания нейрон должен как бы выбрать тот или иной нейромедиатор. Процесс такого выбора наблюдался на симпатических нервных клетках крыс в период эмбрионального развития и в клеточной культуре.

Симпатическая нервная система содержит адренэргические или холинэргические клетки. Симпатические ганглии содержат оба типа клеток, а также не нейрональные клетки. Если ганглионарные клетки новорожденных крыс выращивают в отсутствие не нейрональных клеток, то они продуцируют только норадреналин и образуют характерные синаптические везикулы адренэргических нейронов. В случае если такие клетки присутствуют, то продуцируется медиатор ацетилхолин [1]. Затем было показано, что совсем не обязательно наличие не нейрональных клеток, сама культуральная среда, в которой они растут, обуславливает производство адренэргических или холинэргических клеток. Сигнал к развитию определенного типа клеток подает белок (М 45 000), который выполняет роль своеобразного переключателя клеточной дифференциации. Стало возможным даже идентифицировать клетки в процессе переключения, поскольку они образуют одновременно холинэргические и адренэргические синапсы.

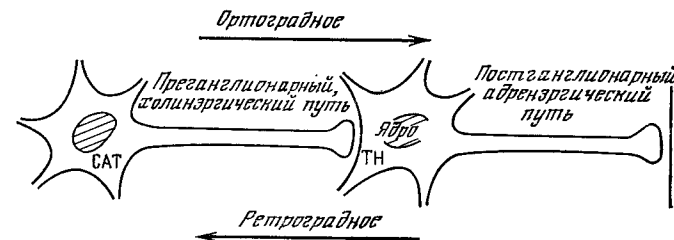


Рис. 11.2. Межсинаптическая регуляция. Индукция тирозингидроксилазы (ТН) при преганглионарной холинэргической иннервации (ортоградное направление). В обратном (ретроградном) направлении активность постганглионарной адренэргической системы действует на холинацетилтрансферазу (САТ) в холинэргических клетках.

Межсинаптическая регуляция: ортоградная и ретроградная

Примеры, приведенные выше, показывают, что «трофические факторы», т. е. химические сигналы, поступающие от окружающих клеток, могут влиять на события, происходящие в нейроне. Они могут исходить от не нейрональных клеток, не имеющих прямого контакта с нервной клеткой, а поступать также из другой нервной клетки и действовать через синаптический контакт. Один из примеров такого межсинаптического взаимодействия — индукция тирозингидроксилазы (и допамин-β-гидроксилазы) при холинэргической стимуляции в преганглии (рис. 11.2) [3]. Тирозингидроксилаза — это ключевой фермент катехоламинового синтеза (гл. 8). И синтез, и активность такого фермента регули-

ругуются ацетилхолином через сАМР в качестве *вторичного мессенджера*, т. е., возможно, с помощью сАМР-зависимой протеинкиназы. Этот процесс хорошо изучен с использованием в качестве модели цервикального ганглия новорожденных мышей и крыс. Установлено, что после рождения активность тирозингидроксилазы возрастает в ~ 8 раз. Если, однако, перерезать преганглионарные холинэргические пути, то активации не происходит. Блокаторы никотиновых холинэргических рецепторов могут вызывать тот же эффект (но не α -бунгаротоксин — типичный блокирующий агент периферических ацетилхолиновых рецепторов, который не действует на ганглионарные рецепторы).

Таким образом, в «физиологическом направлении» (ортоградном или антероградном межсинаптическом) развитие постсинаптического адренэргического нейрона, по-видимому, регулируется никотиновым холинэргическим нервным окончанием. В противоположном направлении (ретроградном межсинаптическом) процесс также регулируется. Если же происходит селективное повреждение постсинаптической клетки, то постнатальное увеличение активности холиновой ацетилтрансферазы не обнаруживается.

Все это — модулирующие эффекты, влияющие на синтез медиатора и происходящие после определенной стадии дифференциации. Молекулярный механизм подобной модуляции еще неизвестен, участниками этого процесса являются медиатор, возможно, ионная среда и трофические факторы. Тирозингидроксилаза также индуцируется фактором роста нерва (NGF), который захватывается нервным окончанием при пиноцитозе и отсюда переносится к ядру клетки путем ретроградного аксонального транспорта.

Дифференциация ионных каналов и возбудимость

Нервные клетки содержат не только собственные медиаторы, они характеризуются и собственной возбудимостью. Мы обсудим природу химической возбудимости вместе с обсуждением синаптогенеза. Электрическая возбудимость нейронов, или способность генерировать и передавать потенциалы действия, возникает очень рано, при эмбриональном развитии [4]. У многих видов яйцеклетки генерируют потенциалы действия, но они во многих отношениях отличаются от потенциалов дифференцированных клеток. Ионные каналы, лежащие в основе электровозбудимости, претерпевают коренные изменения в ходе развития. Во многих случаях входящий ток первоначально обусловлен потоком ионов кальция, а не натрия. При этом тетродотоксин (ТТХ) не оказывает влияния на натриевый поток. Изменение ионной зависимости сопровождается уменьшением длительности

потенциала действия. Механизм и биологическое значение этих изменений неизвестны. Хемочувствительные ионные каналы, как и каналы, регулируемые ацетилхолином, не претерпевают таких изменений в ионной специфичности.

Имеются разнообразные программы клеточной дифференциации

Можно представить себе, что обычный «регуляторный ген», активированный соответствующим сигналом дифференциации, инициирует биосинтез всех компонентов клетки, характерных для соответствующей стадии дифференциации. Но это не так. Например, стадии, необходимые для морфологической дифференциации, регулируются независимо от стадий, необходимых для синтеза медиатора. Эта область исследования бурно развивается и мы должны удовлетвориться кратким описанием, чтобы не утонуть в потоке предварительных наблюдений. Один из методов исследования заключается в действии на подходящую клеточную линию биологических (например, фактор роста нерва, сокращенно NGF; рис. 11.3) или искусственных (например, дибутирил-сАМР, диметилсульфоксид) стимулов до тех пор, пока нейриты разрастутся; параллельно устанавливаются, например, изменения состава ферментов или мембранных белков. Интересно отметить, что в ходе дифференциации *in vitro* наблюдались только количественные изменения в составе белка таких клеточных линий: хотя используемый для анализа метод двумерного электрофореза очень чувствителен, ни один новый белок не был идентифицирован и ни один из ранее присутствовавших белков не исчез.

Трофические факторы

Дифференциация происходит в результате взаимодействия генетической программы и факторов окружающей среды. Вещества, которые эффективно стимулируют дифференциацию и рост клетки, называются трофическими факторами; они могут продуцироваться органами-мишенями данного нейрона, окружающими его глиальными клетками или одним из иннервированных нейронов. Если мы вспомним ганглионарные клетки симпатических нервов, то увидим, что действие не нейрональных клеток осуществляется как в ортоградном (антероградном), так и ретроградном направлениях. Кроме такой межсинаптической регуляции, трофические факторы играют определенную роль в выживании клетки, миграции клетки, развитии нейритов (аксонов или дендритов) в направлении их мишеней, образовании и стабилизации специфических синапсов. Трофические факторы актив-

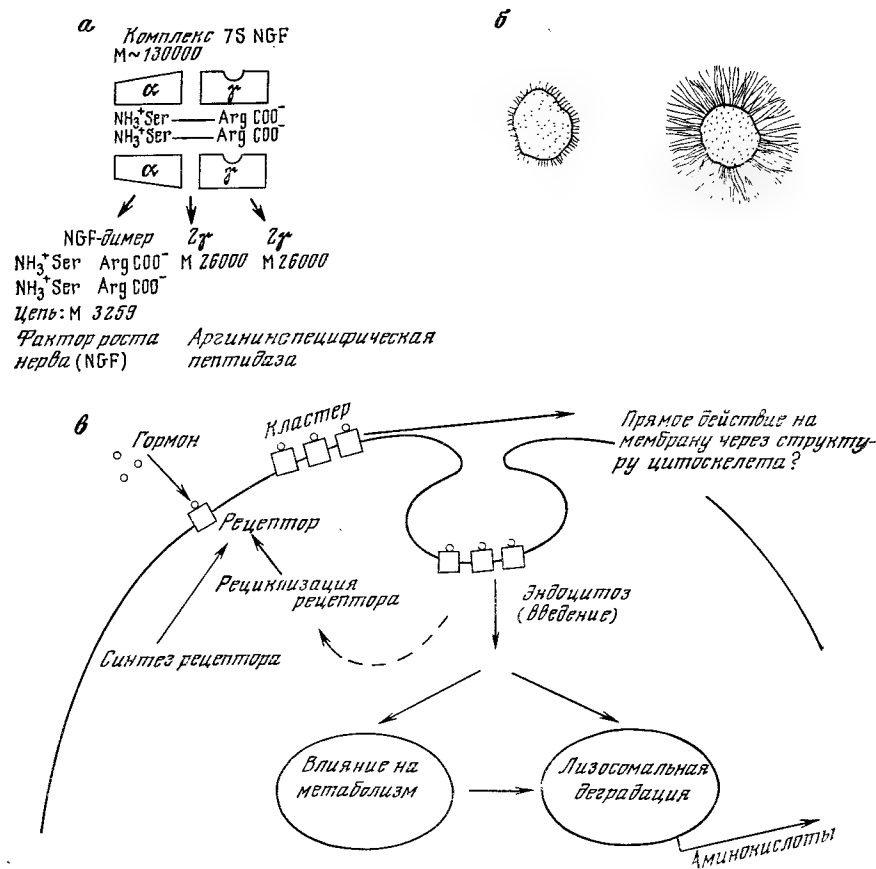


Рис. 11.3. Фактор роста нерва (NGF). а — субъединичная структура комплекса 7S и β-NGF [Sewer, Shooter, Adv. Protein Chem., 31, 339—409 (1977)]; б — сенсорный ганглий зародыша цыпленка; слева — без NGF; справа — с NGF; в — модель взаимодействия NGF с клеткой-мишенью, которая приложима и к другим пептидным гормонам. (Воспроизводится с разрешения P. Laver, Tübingen.)

ны не только в период развития, но выполняют эти же функции и в зрелом организме. Биохимический термин «трофический фактор» недостаточно определен. Только в отдельных случаях трофические факторы были выделены и химически охарактеризованы, в большинстве случаев их существование просто предполагалось из наблюдений или постулировалось. Трофический фактор может быть белком, как в случае NGF (фактор роста нерва), низкомолекулярным соединением (медиатор, метаболит) или ионом (Ca^{2+} , K^{+}). Ионы выполняют роль трофического фак-

тора при функциональном взаимодействии между нейроном и клеткой-мишенью. Мы вернемся к этому в разделе о стабилизации синапса и пластичности. Механизмы действия трофических факторов так же многогранны, как и молекулярные структуры. Они могут либо поглощаться клеткой и действовать непосредственно на ядро клетки, либо влиять на клеточную мембрану через вторичный мессенджер.

Фактор роста нерва (NGF)

Наиболее изученный трофический фактор — фактор роста нерва (NGF), открытый Леви-Монталсини и Гамбургером в 1950 г. [5]. Этот фактор стимулирует рост периферических сенсорных и симпатических нейронов и необходим для выживания зрелого синаптического нейрона. NGF стимулирует также разветвления образований аксонального типа эмбриональных клеток ганглия в культуре (рис. 11.3, б). Этот эффект используется для его биологического тестирования и выделения. NGF найден во многих нервных и иных тканях, но не в крови.

Было показано на клеточной культуре, что NGF синтезируется и секретируется несколькими типами клеток. NGF присутствует в высоких концентрациях в подчелюстной слюнной железе самца мыши, из которой его можно выделить в миллиграммовых количествах. Такой высокой концентрации фактора не наблюдается у самки и у незрелого самца мыши. Мы пока не можем объяснить физиологического значения этого факта. В любом случае подчелюстная слюнная железа не является единственным местом синтеза NGF, но так как большая его часть секретируется в слюну, он должен обладать скорее экзокринной, чем эндокринной функцией. Если железу удалить, концентрация NGF в различных тканях животного временно уменьшается, однако снова восстанавливается до нормы даже без регенерации железы. В организме есть еще один пока неизвестный орган, синтезирующий NGF.

Молекула NGF

NGF — это белок, не содержащий ни углеводной, ни липидной частей. До сих пор структурные исследования проводились в основном на NGF мыши, но он был найден в примерно такой же высокой концентрации в ядах змей семейств *Crotalidae*, *Viperidae* и *Elapidae*. Субъединица NGF мыши, обладающая активностью при концентрации несколько нанограммов на миллилитр, представляет собой полипептид (M 13 250), включающий 118 аминокислот. Вторичная структура этого полипептида характеризуется несколькими α-спиральными участками, а третич-

ная структура стабилизируется тремя дисульфидными связями. Определена аминокислотная последовательность NGF.

Белок, выделенный из подчелюстной слюнной железы, имеет более сложное строение (рис. 11.3, а); он представляет собой димер с двумя нековалентно связанными идентичными цепями (β -NGF). Этот димер в свою очередь входит в состав белкового комплекса, называемого в соответствии с величиной коэффициента седиментации 7S NGF, и содержит еще две α - и две γ -цепи, каждая с M 26 000. Для всего комплекса M 130 000. α - и γ -Цепи необязательны для проявления биологической активности. О функции α -цепи известно лишь, что она ингибирует β -NGF. В то же время γ -субъединица имеет аргининспецифичную протеазную активность и структурную гомологию с трипсином. Она участвует в протеолитическом превращении высокомолекулярного предшественника β -NGF. Такой про- β -NGF с M 22 000 уже найден.

Помимо образования из предшественника β -NGF имеет и другие общие с гормонами свойства: он обладает существенной структурной гомологией с инсулином и релаксином, а также проявляет неподавляемую инсулиноподобную активность (NSILA). Очевидно, имеется эволюционная связь с этими пептидными гормонами.

Механизм действия NGF неизвестен

Плазматические мембраны нейронов и мембраны некоторых не нейрональных клеток содержат специфические рецепторы (рецепторы NGF), которые связывают NGF вначале с низким, а затем с высоким сродством. Было показано, что рецепторы с высоким сродством образуют кластеры и вместе со связанным NGF попадают в клетку при эндоцитозе и транспортируются внутри клетки частично к лизосомам (где происходит их деградация), частично к ядру. При их поглощении нервным окончанием рецептор и NGF переносятся путем ретроградного аксонального транспорта. Подобные процессы могут происходить и при других типах гормональной регуляции и поэтому NGF служит своеобразной моделью гормонов и факторов роста.

Механизм действия NGF в клетке не изучен. В ответ на действие NGF наблюдалось фосфорилирование белка и поэтому было постулировано участие в этом процессе cAMP-зависимой протеинкиназы. Идентифицировано несколько субстратов NGF-активированного фосфорилирования (среди них тирозингидроксилаза, рибосомальный белок S6, гистоны H1 и H3 и негистонные ядерные белки), но не показана связь между этими процессами и физиологической функцией NGF.

Фактор роста нерва также стимулирует поглощение уридина, образование полисом, синтез белков, липидов, РНК и потребление глюкозы. Благодаря этому он способствует росту и выживанию симпатических и сенсорных нейронов. NGF активирует рост аксонов и дендритов, осуществляя контроль за сборкой микротрубочек. Если антитела против NGF вводятся мыши, ее симпатическая нервная система дегенерирует. Роль NGF как трофического фактора можно проиллюстрировать на примере его способности индуцировать тирозингидроксилазу — ключевой фермент синтеза катехоламинов.

NGF регулирует дифференциацию, выживание и рост нервных клеток в направлении мишени

NGF выполняет функцию не только «фактора выживания», но и «фактора дифференциации». Это ясно видно на клетках феохромоцитомы (PC 12) — линии опухолевых клеток, происходящих из (не нейрональных) хромоаффинных клеток мозгового вещества надпочечников. В отличие от нервных клеток они делятся в клеточной культуре и будучи хромоаффинными клетками способны к синтезу, хранению и высвобождению катехоламинов. Под влиянием NGF клетки феохромоцитомы дифференцируют далее в направлении нервных клеток: они останавливают пролиферацию и способствуют нейритным процессам; становятся электровозбудимыми и чувствительными к ацетилхолину и развивают способность к образованию синаптических контактов.

Кроме функции выживания и дифференциации имеется еще одна область действия NGF, а именно направленный рост нейронов. Можно продемонстрировать *in vitro*, что нейриты выбирают направление своего роста в зависимости от градиента концентрации NGF; это явление напоминает хемотаксис (гл. 12). Физиологическая роль NGF лучше всего отражена следующей гипотезой: периферические ткани-мишени продуцируют NGF, который путем хемотаксиса направляет рост аксонов к их мишени. Недостаток фактора может даже ограничить число аксонов, достигающих мишень.

Имеются ли другие факторы роста нерва?

Маловероятно, что NGF — это единственный белок с такой функцией. Действительно, имеются многочисленные доказательства существования и других трофических факторов [6]. Сенсорные нервные волокна, например, встраиваются в ткани мишени *in vitro*, даже когда весь NGF удален с помощью антител к этому белку. Далее из мозга свиньи был выделен белок с

М 12 300, который способствует выживанию в культуре и появлению отростков у сенсорных нейронов цыпленка, однако этот белок отличается от NGF по антигенным и функциональным свойствам. Наконец, имеется очевидное, хотя и косвенное, свидетельство существования фактора роста мотонейронов (MNGF), влияющего на соматические двигательные нейроны. Возможно, MNGF и есть еще один важный трофический фактор, который бы следовало охарактеризовать биохимически. Однако из-за низкой концентрации этого фактора в соответствующих тканях его дальнейшее исследование потребует применения методов генной инженерии.

Синаптогенез

При развитии синапса происходит постсинаптическая специализация в мембранах клеток-мишеней, появляются специфические рецепторы нейромедиаторов и расширяются постсинаптические области при окончании («конус роста») иннервирующего аксона. Несомненно, эти процессы координированы. Конечно, как указывалось выше, имеется много отдельных программ дифференциации, а не просто один «ген синапса», контролирующий синтез всех компонентов синапса.

Рассмотрим вновь постсинаптическую область и, следовательно, вернемся к вопросу, когда в процессе развития возбудимой клетки появляются специфические рецепторы медиаторов? Ответ получен при изучении первичных культур мышечных клеток [2]. Развитие полиядерных миотрубочек из миобластов можно проследить *in vitro* как морфологическими, так и биохимическими методами. Это — Ca^{2+} -зависимый процесс, протекающий параллельно с появлением ацетилхолиновых рецепторов. Однако такой параллелизм не предполагает причинной зависимости: ведь в отсутствие Ca^{2+} не происходит слияния миобластов, но тем не менее ацетилхолиновые рецепторы образуются и даже достигают той же плотности, что и в присутствии Ca^{2+} . Это было установлено в экспериментах с клеточной линией мышечной опухоли, в которой клетки потеряли способность к слиянию и образованию миотрубочек. В этих клетках после логарифмической фазы роста также синтезировались ацетилхолиновые рецепторы. Ацетилхолиновые рецепторы и активность ацетилхолинэстеразы регулируются, по-видимому, общим механизмом. Изменение их активности всегда происходит одновременно.

В зрелой иннервированной мышечной клетке ацетилхолиновые рецепторы не распределяются равномерно по всей клеточной мембране, их концентрация в субсинаптической области концевой пластинки в 100 раз выше, чем во внесинаптической.

В гл. 9 мы видели, что подобная плотность рецепторов связана с наличием нервов или электрической активности. Ацетилхолиновые рецепторы в не иннервированных миотрубочках также распределяются неравномерно с образованием *кластеров*, которые детектируются оптическими методами с помощью α -бунгаротоксина, меченного флуоресцентным красителем, или ауторадиографически с использованием радиоактивно меченного токсина. Эти рецепторы практически иммобилизованы в кластерах, в то время как свободные рецепторы в мембране способны диффундировать и передвигаться. Естественно предположить, что кластеры образуют на поверхности клеток мышц области-мишени для растущих нейритов, но, видимо, на самом деле происходит обратное: на участке, где нервное волокно впервые контактирует с мышечной клеткой, существенно повышается концентрация рецептора. Это обнаружено на смешанной культуре нейронов спинного мозга и клеток мышц лягушки *Xenopus*. Недавно было установлено, что в этом процессе принимает участие *фактор белковой природы, способствующий агрегации*.

Возникает вопрос о роли медиатора в синаптогенезе или, в более широком смысле, о значении клеточной активности. Если линия мышечных клеток растет в присутствии агонистов, например карбамоилхолина, концентрация рецептора вопреки ожиданиям уменьшается (до 50%). В то же время присутствие агонистов и антагонистов не влияет на образование функциональных синапсов. Даже если ацетилхолиновые рецепторы блокируются α -бунгаротоксином, синапсы все-таки образуются. Поскольку тетродотоксин увеличивает концентрацию рецепторов, его присутствие, как и электрическая активность мышечных клеток, не влияет на синаптогенез. Тем не менее ацетилхолинэстераза не появляется на синапсе, блокированном кура-ре, и в электрически неактивных мышечных клетках.

Намного труднее исследовать биохимию синаптогенеза, так как еще не удалось продемонстрировать функциональный синаптогенез между клонированными клеточными линиями нейронов. Для этого процесса необходимо наличие нескольких гомогенных клеточных популяций из первичных культур и, таким образом, клеток, которые были получены из различных органов, например ганглия или ретины. Определенный прогресс был достигнут после открытия, что гибридные клетки, полученные при слиянии нейробластомы с клетками глиомы, способны к образованию химических синапсов [7]. Этот результат указывает на возможные хелперные функции глиальных клеток при функционировании нервов.

До сих пор большая часть наших утверждений о синаптогенезе носила характер отрицания: синтез рецептора не зависит

от образования микротрубочек или от присутствия медиатора или Ca^{2+} ; синаптический контакт не обусловлен наличием медиатора, электрической активностью или образованием функциональных рецепторов. Ни одно из исследований, сделанных до сих пор, полностью не отвечает на вопрос о механизме образования, специфичности и стабилизации синапсов и не решает проблемы этапного образования нейронной сети, ответственной за высшие функции нервной системы. В начале этой главы мы осветили этот вопрос как один из наиболее важных в нейробиологии, однако подробнее рассмотрим его немного позже.

Одним из наиболее ярких указаний на важность взаимодействия между клетками при образовании синапсов является «гибель нервной клетки». В определенный момент эмбрионального развития 50—80% нейронов гибнут. Отмирание по времени соответствует моменту, когда аксоны достигают участка мишени. Можно предположить, что все нейроны, которые не образуют постоянных синаптических контактов, гибнут. Возникла гипотеза, что существует трофический фактор, который переносится в ретроградном направлении от синапса к соме и необходим для стабилизации клетки.

У взрослой особи млекопитающих каждое мышечное волокно скелетной мышцы иннервировано только одним нейроном. В то же время у новорожденных крыс и кошек на одно мышечное волокно приходится много аксонов. Следовательно, при развитии избыток аксонов ликвидируется и «выживает» лишь один аксон.

Гипотеза «селективной стабилизации» синапсов

Вышеприведенные и некоторые другие наблюдения легли в основу гипотезы «селективной стабилизации», как механизма образования функциональных синапсов и нейронной сети [8]. Постулируется, что имеется определенный «избыток» лабильных контактов и только немногие из них превращаются в стабильные синапсы. Альтернативная гипотеза Сперри (теория программирования) предполагает специфическое химическое сродство между окончаниями аксонов и постсинаптической клеткой, которое генетически запрограммировано и однозначно приводит к стабильному синапсу.

Преимущество гипотезы селективной стабилизации перед теорией программирования заключается в том, что в первом случае для образования 10^{14} синапсов требуется меньшее число генов: целые группы нейронов могут кодироваться одним геном и их рост до органа-мишени контролироваться одним общим регуляторным механизмом. Такой эпигенетический механизм мог бы производить тонкую настройку связей системы нейронной сети.

Упомянутые альтернативные гипотезы могут и не быть взаимоисключающими. Имеются доказательства того, что существует химическое сродство между пре- и постсинаптическими клетками [9].

Как указывалось ранее, аксон может преодолеть большое расстояние до своей мишени, минуя бесчисленные клетки-мишени, на которые он не реагирует. Имеются два предположения, касающиеся направленного роста, которые, опять же, не исключают друг друга: либо аксон «ведет» микрофиламенты (но неясно, как они прокладывают такой специфичный маршрут), либо, согласно Сперри, он растет против химического градиента, создаваемого мишенью, который и есть тот специфический сигнал, сравнимый, возможно, с сигналом хемотаксиса. В любом случае аксон находит и распознает свою мишень. По селективности данный процесс аналогичен взаимодействию рецептора и лиганда или антигена и антитела; однако это взаимодействие непостоянно. На пленках клеточных культур показано, что растущие нейриты находятся в постоянном движении, вырастая и снова втягиваясь, как бы проверяя и зондируя поверхность клетки-мишени перед тем, как образовать постоянный контакт. Специфичность взаимодействия также неабсолютна: если клетки-мишени повреждаются, синапсы могут образоваться с клетками других типов. Вот, что обнаруживалось в экспериментах с мозжечком: афферентные волокна мозжечка обычно образуют синапсы с дендритами гранулярных клеток; при селективном повреждении последних они образуют функциональные синапсы с отростками клеток Пуркинье (см. также гл. 12). Генетически детерминированная химическая специфичность синапсов (жесткость), таким образом, неабсолютно выполняемое свойство; оно реализуется достаточно гибко (в этом случае говорят о синаптической пластичности), что предполагает существование механизмов переориентации, возмущающих генетический пробел. При этом существенную роль играет активность или строение синапса. Важная роль сенсорного ввода при создании функциональной нервной системы была продемонстрирована выдающимися экспериментами Хубеля и Визеля на оптической системе кошки.

Гипотеза селективной стабилизации очень привлекательна, поскольку она не только разрешает проблему, упоминавшуюся в начале этой главы (несоответствие между числом генов и числом специфических синапсов), но и помогает в конструировании модели процессов обучения и памяти, превращения нефункционального или лабильного синапса в стабильный, т. е. речь здесь идет уже о процессе хранения информации. Именно появление этой гипотезы позволило начать действительное рас-

пространение нейрохимических подходов на объяснение и моделирование процесса образования синапса.

Возникает целый ряд вопросов об участвующих здесь механизмах и молекулярных процессах. Какова молекулярная природа постулированного градиента и молекул клеточной поверхности, которые, как предполагается, необходимы для узнавания и специфичности контакта? Какого рода молекулярные изменения превращают лабильный синапс в стабильный? Какими химическими или физическими процессами они запускаются? Нейромышечный синапс служит лучшей экспериментальной моделью для ответа на два последних вопроса. Мы уже отметили несколько примеров взаимодействия нервных и мышечных волокон и кратко обсудили молекулярные механизмы этих процессов (гл. 9). Необходимо также иметь в виду изменения в постсинаптической мембране, которые следуют за денервацией, т. е. прерыванием синаптической активности (гиперсенситизацией, с. 264). Однако такие эксперименты не дают ответа на наши вопросы, а только свидетельствуют о способности к изменениям (пластичности) синаптических компонентов. Синаптическая пластичность не только интересна для понимания механизмов развития нервной системы, но, как указано выше, также для моделирования высших функций, таких, как обучение и память. Мы рассмотрим их в последующих разделах.

Пластичность

Термин «пластичность» подразумевает способность клеточной системы влиять на жесткий детерминизм гена. Система пластична, если ее конфигурация определяется как внутренней регуляцией, так и внешними воздействиями. Таким образом, она обладает достаточной гибкостью для адаптации к изменяющимся условиям среды. Связь генетических факторов и факторов окружающей среды особенно важна при развитии и функционировании нервной системы. Это может быть предметом философской дискуссии преподавателей (воспитателей) и психологов.

Структура и активность белка зависят от химического окружения

В настоящее время крайняя точка зрения, что все предопределено хромосомой, не слишком популярна. Позиция заключается в том, что ДНК детерминирует первичную аминокислотную последовательность белка, и уже эта первичная структура определяет упаковку полипептидной цепи и, следовательно, вторичную и третичную структуры белка и, наконец, его четвертичную структуру, а также ассоциацию с образованием

структур более высокого порядка (самособирающиеся системы). В таком случае активность белка тоже генетически предопределена, а вместе с ней форма и функция организма. Здесь, однако, вмешивается живой элемент пластичности. Вторичная, третичная и четвертичная структуры зависят не только от первичной структуры, но и от окружающей среды: ее pH, ионной силы, концентрации молекул эффекторов и т. д. На эту среду непосредственно влияют внешние факторы (часто опосредованные нервной активностью) и метаболизм, который в свою очередь обусловлен веществами в диете, гормональной и нейрональной регуляцией.

Доказано, что генетический контроль за развитием нервной системы ограничен. Например, Левингтон показал, что у генетически идентичных дафний с одинаково развитой нервной системой число синаптических контактов, локализация участков этих контактов и тонкая структура дендритов различаются. У экспериментальных животных при выработке навыков поведения число и размер дендритных отростков может варьировать. Толщина коры головного мозга крысы зависит от количества сигналов, полученных из среды, окружающей животное (мы еще вернемся к этому). Но решающим доказательством гибкости генетической программы является наша способность обучаться, наша способность хранить в центральной нервной системе информацию, которая не могла быть заложена в хромосому, так как она не предполагалась в ходе эволюции.

Биохимическая основа обучаемости

Весь наш опыт доказывает, что обучаемость не есть сохранение информации в виде отдельных молекул, т. е. здесь нет аналогии с кодированием информации в молекулах ДНК. Поиск «молекул памяти» был популярен в течение долгого времени, например, когда пептид скотофобин (название этого вещества связано с предположением, что оно обуславливает боязнь темноты) был выделен из мозга крыс, дрессированных бояться темноты. Хотя эксперименты такого рода привели в тупик, они не исключают возможности, что обучение связано с очень специфическими молекулярными изменениями в нервной системе и могут быть, в конце концов, объяснены с биохимических позиций.

Биохимические исследования такой функции организма, как память, развивались в двух основных направлениях; одно из них — поиск молекулярных изменений, которые связаны с процессом обучаемости, другой — анализ последствий вмешательства, т. е. метод селективного блокирования или ускорения молекулярного процесса и затем исследование этих эффектов на обучаемость. К сожалению, эти методы в основном описатель-

ны и дают результаты, усредненные по многим единичным химическим реакциям и клеткам нервной системы: они описывают саму «обучаемость», но не механизм запасаания блоков информации. Только в ряде случаев с их помощью можно выявить, действительно ли наблюдаемый процесс есть запасаание информации или это механизм ее извлечения, поскольку процесс запоминания включает, по крайней мере, три стадии: распознавание информации через механизм запоминания, непосредственно запоминание и процесс воспоминания.

Обучаемость зависит от пластичности нервной системы

Процессы запоминания (память как биологическое явление) исследуются в лаборатории на специально обученных животных. В результате дрессировки поведение животных меняется; вот почему мы определяем память как запасаание информации, реализующей приобретенные навыки поведения. Такое биологическое определение, оперирующее особенностями поведения, предполагает, что в принципе между сложным механизмом памяти нашего мозга и простыми условными рефлексами низших организмов нет существенных различий [10—12]. Это допущение относится к единичным событиям и к простым молекулярным изменениям в нервных клетках, участвующих в данных событиях.

Таким образом, мы косвенно уже показали, что теория обучаемости имеет то преимущество, что обучение может быть исследовано нейробиологическими методами [13]: суть в том, что память — это свойство нервных клеток, зависящее от пластичности сети нейронов. Эта гипотеза пластичности была выдвинута итальянскими учеными Танци и Лугаро в конце XIX в. и далее развита Рамоном-и-Кахала; она отличается от «динамической» гипотезы Александра Форбеса и, особенно, гипотезы Лоренте де Но (1938). Последний постулировал существование нейронных контуров, в которых нервные импульсы циркулируют неопределенное время (рис. 11.4). Гипотеза пластичности подразумевает химические изменения, которые могут приводить к морфологическим отличиям: выросты нейритов и образование синапсов, тогда как «динамическая» гипотеза предусматривает электрические изменения. След, оставляемый запасенной информацией, так называемый *энграм*, должен иметь или химическую, или электрическую природу.

Целый ряд экспериментов отвергает электрическую природу энграм. Показано, что когда нервную систему подвергают электрическому шоку или охлаждению до температуры, при которой не проявляется нервная активность, информация, запасенная при обучении, не теряется. При этом, однако, дела-

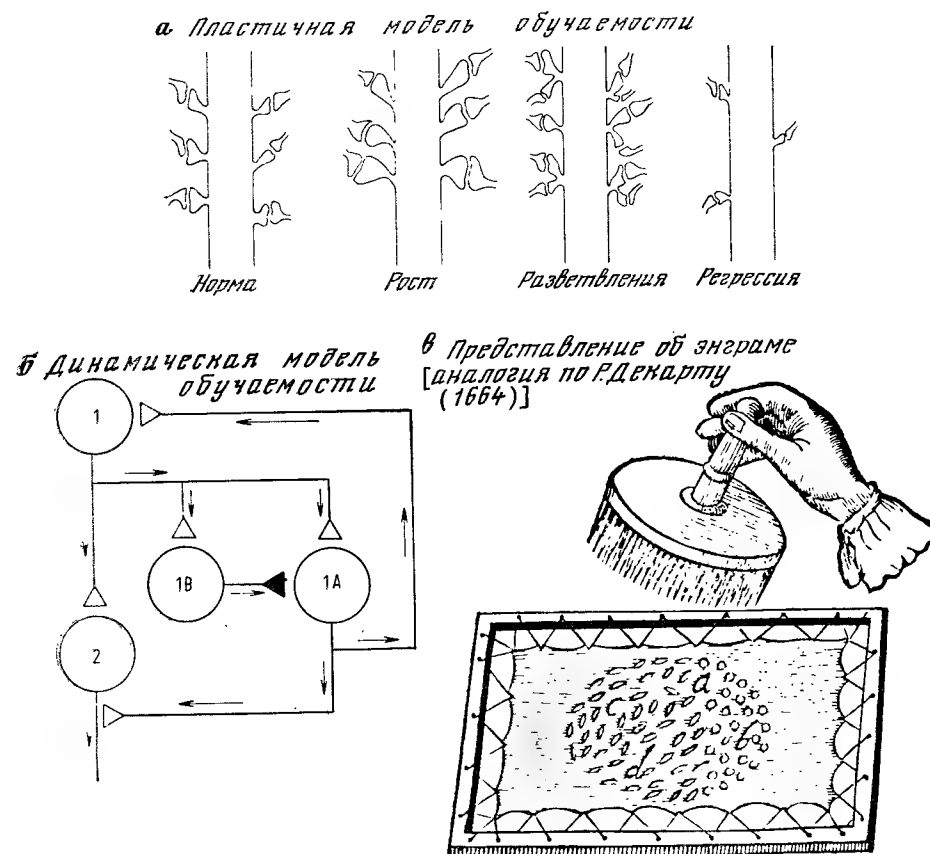


Рис. 11.4. Альтернативные модели обучаемости. *а* — пластичность синаптических контактов, имеющая место при росте и регрессии в зависимости от интенсивности; в качестве примера взяты дендритные синапсы [14а]; *б* — запасаание информации при циркуляции нервного импульса по замкнутому кругу. Клетка 1 возбуждает клетку 2, 1В и 1А. Клетка 1А в свою очередь возбуждает клетку 1 и таким образом поддерживает циркуляцию импульсов [10]; *в* — модель обучаемости по Декарту: таким же образом, как набор иголок протыкает материал, так и информация делает дырки для того, чтобы «вскрыть» мембрану третьего желудочка мозга [Descartes, *Traite de l'Homme*, 1664].

ется невозможным обучение, т. е. сам процесс запасаания информации. В настоящее время полагают, что память бывает по крайней мере двух типов — кратковременная и долговременная; первая основана на временном сохранении нервного импульса в нейронной цепи (рис. 11.4, б). Согласно одной из нескольких теорий, выдвинутых Хеббом, информация (постоянная или воз-

растающая), которая временно хранится в осцилляторных электрических цепях, в химическом запасающем устройстве трансформируется в молекулярные изменения в нейроне — своеобразное химическое кодирование памяти.

Примеры обучаемости

Выделено несколько уровней сложности процессов обучаемости и памяти, для которых подобраны подходящие экспериментальные модели и предложены нейрохимические объяснения.

1. *Процесс адаптации* есть, в самом широком смысле, процесс обучаемости. В гл. 12 хемотаксис бактерий описан как модель восприятия и поведения. В ряду других «умственных» свойств этих одноклеточных организмов стоит их способность к обучению: при индукции подходящего фермента бактерия может «научиться» расти в специфической среде; при индукции соответствующего рецептора бактерия может «выучиться» передвигаться в область высокой концентрации рибозы, а не в область высокой концентрации галактозы, как прежде. Хотя при этом не задействована нервная система, описание исследований Адлера и Кошланда по восприятию и процессингу сигнала в хемотаксических бактериях и их интерпретация могут составить целый интересный раздел нейробиологии.

2. Еще один пример обучаемости — *привыкание*. Если ударить молотком по твердому предмету рядом с мышью, она убежит. Однако если дважды в день в течение часа повторять удары через каждые 5 с, то через 20 дней животное привыкнет к шуму и число убеганий уменьшится на 90%. Обратное явление — увеличение числа рефлекторных ответов на повторяющийся стимул, называется *сенситизацией*. Оба явления связаны с *депрессией* и *потенцированием*, и их можно экспериментально продемонстрировать в одиночных нервных клетках с помощью электрофизиологических методов. Молекулярные механизмы, которые связаны с потенцированием, детально обсуждаются ниже.

3. Третий пример — выработка *условного рефлекса*. Неэффективный, т. е. не вызывающий ответа стимул, может выработать условный рефлекс, если он сочетается с безусловным стимулом. У собаки безусловный стимул — пища, рефлекторный ответ — выделение желудочного сока. Если выдача пищи ассоциируется у животного в течение долгого времени с позвякиванием миски, то этот звуковой первоначально неэффективный сигнал может затем вызвать секрецию и в отсутствие безусловного стимула. Собака привыкает, и в ответ на шум выделяется желудочный сок. Это и есть «условный рефлекс». Здесь сочетаются многие нервные пути: основное свойство условного

рефлекса также можно показать на простой модельной системе; объяснение с привлечением свойств нервных клеток и прохождения их импульсов было дано главным образом Кандел и сотр. [10], которые проводили эксперименты на нейроганглии *Aplysia* [10] (см. гл. 12).

Высшие уровни памяти, например восприятие языка или абстрактных понятий, которые отличаются от уже упомянутых примеров обучаемости только более высоким уровнем сложности, все еще не могут быть объяснены с помощью разумных гипотез. Кроме всего прочего, как у низших, так и у высших организмов, у беспозвоночных и позвоночных свойства нервных клеток, механизмы передачи нервного импульса, модуляция и пластичность характеризуются значительным сходством. Но также ясно, что в приведенных примерах невозможно проводить адекватное сравнение. При исследовании посттетанического расслабления в гиппокампе (см. ниже) вся определенная досих пор нервная пластичность происходит за секунды и минуты, иногда часы, тогда как долговременная память сохраняется дни, месяцы и годы, иногда в течение всей человеческой жизни.

Область обучаемости

Из того, что уже было сказано, следует, что обучаемость — общее свойство нервной системы, а сложные формы обучения присущи только центральной нервной системе. В мозге высших организмов нет, однако, специальной области, где запасается информация, т. е. нет органа памяти в узком смысле слова. По-видимому, специализированная информация (зрительная, акустическая, сенсорная, двигательная и т. д.) хранится в областях коры головного мозга, обуславливающих соответствующие функции. В то же время вполне вероятно, что память должна включать кооперативное взаимодействие относительно больших областей коры и других участков мозга. Эта концепция в тридцатых годах подтверждена работами Лашли, он установил, что потеря памяти при операциях на коре головного мозга примерно пропорциональна количеству удаляемой ткани, но не зависит от участка операции. В то же время имеются многочисленные клинические наблюдения, которые показывают, что вслед за повреждением части коры головного мозга в результате несчастного случая, опухоли и т. д. другая часть мозга может после определенной тренировки принять на себя функции поврежденного участка (*реабилитация*). Таким образом, если память и ограничена определенными участками коры мозга, то эта локализация пластична.

Не только неокортекс, но и гиппокамп играет, видимо, особую роль. Очаги повреждения этой части лимбической системы

не приводят к потере прежде накопленной информации, но повреждают механизм запоминания. Таким образом, гиппокамп не является хранилищем информации, а ответствен за консолидацию памяти или трансформацию кратковременной памяти в долговременную.

В поисках анатомических структур и механизмов, вовлеченных в процесс памяти, следует иметь в виду, что почти невозможно разделить механизм запасаения от механизмов передачи и запоминания. Потеря памяти обычно включает все три аспекта и только в благоприятных случаях они могут быть разделены. Различие между *ретроградной* и *антероградной амнезией* показано для следующего случая. Удаление гиппокампа у ставшего теперь знаменитым пациента Н. М. в качестве последнего средства лечения его тяжелой эпилепсии привело к антероградной амнезии. При постоянном повторении Н. М. мог посредством своей кратковременной памяти запоминать на несколько минут факты, однако, если его отвлекали, он мгновенно все это забывал, так как переход в долговременную память не функционировал. Перед операцией он нормально обучался, после операции все, что он узнавал, немедленно забывалось.

Обратный случай — синдром Корсакова. Пациенты с этим заболеванием, возникающим вследствие сильного отравления или алкоголизма, страдают ретроградной амнезией. Они постепенно забывают старые события, но могут запоминать новые факты. Это означает, что при таком типе амнезии задет не столько механизм запоминания, сколько механизм извлечения или хранения информации.

Запасенная информация должна оставлять следы (энграммы) в клеточной и молекулярной структуре нервной системы. Наиболее вероятно, все это происходит в синапсе: как указывалось в гл. 1, качество элемента информации не кодируется потенциалом действия, а в основном обусловлено сетью синаптических сопряжений. Посттетаническое расслабление является своеобразной моделью энграммы на уровне синапса.

Посттетаническое расслабление — синаптическая «память»?

Если нервный путь в течение некоторого времени подвергать постсинаптической стимуляции с частотой, например 40 Гц, то иногда через несколько минут происходит усиление постсинаптического ответа на пресинаптический импульс (рис. 11.5). Это явление было открыто Лараби и Бронком в 1947 г. и названо посттетаническим расслаблением или потенцированием; с недавних пор все чаще используется термин долговременное потенцирование (LTP). Потенцирование представляет собой классический пример пластичности нервной системы на клеточ-

ном уровне. Если осуществляется высокочастотная стимуляция постсинаптической области, то расслабления не наблюдается; таким образом, это не есть механизм потенциала действия *per se*, который предопределяется повторной активацией.

Если у клетки имеется несколько афферентов, расслабление происходит только в тех волокнах, которые подвергались тетаническому стимулированию, ответ клетки на импульс через другие афферентные пути остается неизменным. Следовательно,

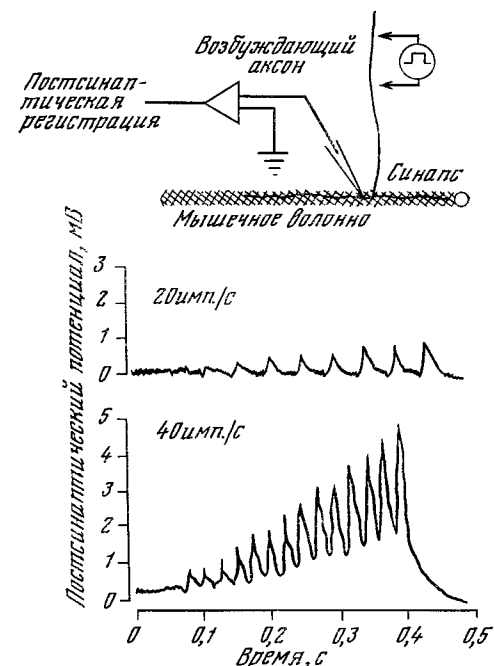


Рис. 11.5. Сенситизация концевой пластинки ракообразного при скорости стимуляции 20 и 40 стимулов/с. Постепенно увеличивается постсинаптический потенциал [18]. (Воспроизводится с разрешения *Dudel* и *Journal of Physiology*.)

основы расслабления, называемого электрофизиологами *гомо-синаптическим расслаблением*, следует искать только в стимулированных синапсах. Более полный анализ показал, что стимуляция приводит к увеличению числа высвобождаемых квантов нейромедиатора, т. е. изменению частоты, а не амплитуды миниатюрных потенциалов концевых пластинок. Медиатор, вводимый извне в синапс, не приводит к расслаблению, а, напротив, вызывает десенситизацию постсинаптических рецепторов (гл. 8 и 9). Таким образом, расслабление, очевидно, зави-

сит от повышения выброса пресинаптического медиатора, кроме того, оно имеет место, когда натриевые каналы блокируются тетродотоксином и клетки деполяризуются с помощью электродов. Итак, расслабление вызывается не путем входа ионов натрия в нервное окончание при потенциале действия, а путем повышения концентрации кальция в синаптическом окончании вследствие притока его во время деполяризации. Обычно Ca^{2+} немедленно удаляется с помощью механизмов, обсуждаемых в гл. 7, но если импульсы идут один за другим слишком быстро, эти системы не справляются с удалением поступающего кальция и повышение его концентрации способствует высвобождению медиатора. Таким образом, можно предположить, что молекулярные процессы, лежащие в основе расслабления, связаны с фосфорилированием компонентов цитоскелета, возможно с протеинкиназой С, зависящей от Ca^{2+} -фосфолипида.

Еще одна интересная гипотеза утверждает, что молекулярные события, вызывающие долговременное потенцирование, происходят на постсинаптической стороне: Линц и Баудри наблюдали увеличение концентрации глутаматных рецепторов после тетанической стимуляции гиппокампа. Подобное увеличение обусловлено функционированием уже существующих рецепторов, как бы «спрятанных» до этого в постсинаптической мембране, а не появлением вновь синтезированных рецепторов. Как указывалось в гл. 9, функциональное экспонирование глутаматных рецепторов происходит в результате протеолиза спектрина мозга — *фодрина*, который вследствие тетанической стимуляции гидролизует Ca^{2+} -зависимой тиоловой протеазой *калпаином* [14].

В некоторых нервных системах наблюдался обратный эффект уменьшения постсинаптического ответа на тетанический стимул. И посттетаническая депрессия, и расслабление показывают, что передача импульса идет не по стереотипу, а испытывает влияние предыстории синаптической активности. Синапс как бы обладает памятью, и многие исследователи, прежде всего Экклс [14], рассматривают это его свойство как основу обучаемости, заложенную в центральной нервной системе.

Мы снова вернемся к методам, которыми исследовался энграм (след памяти).

Локализация памяти с помощью ингибиторов

Ингибиторы синтеза ДНК, например арабинозилцитозин (рис. 11.6), не препятствуют запасанию информации. Это не так удивительно, как могло бы показаться, поскольку дифференцированные нервные клетки уже не делятся и метаболизм

ДНК в них блокирован. Обучение, следовательно, не связано с хранением информации в ДНК (иначе здесь содержалось бы прямое противоречие с главной концепцией молекулярной биологии) и с образованием новых нервных клеток. Подобные эксперименты также исключают, что запоминание связано с синтезом ДНК и делением глиальных клеток. Естественно, что при анализе результатов таких экспериментов следует принимать во внимание цитотоксичность использованного реагента.

Ингибирование транскрипции и трансляции значительно влияет на обучаемость животных. Хайден в серии своих классических опытов продемонстрировал, что содержание РНК в нервной ткани заметно увеличивается в период обучения; с по-

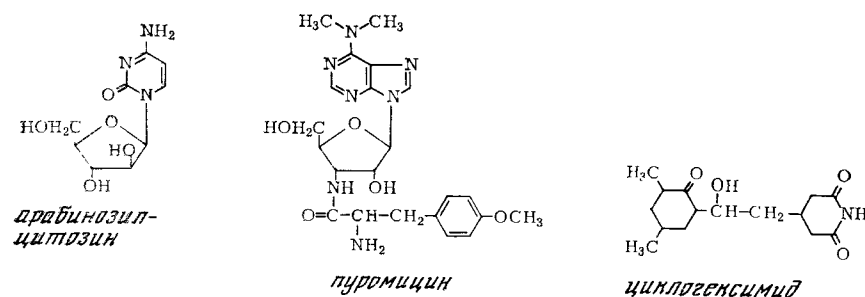


Рис. 11.6. Антибиотики. Блокаторы синтеза ДНК (арабинозилцитозин) не влияют на обучаемость и память; блокаторы трансляции (пуроминцин, циклогексими́д) влияют на эти функции.

мощью радиоактивных предшественников РНК показано, что обучение сопровождается синтезом РНК *de novo*. Блокаторы транскрипции приводят к амнезии, но здесь трудно отделить цитотоксический эффект от собственно амнезии. Увеличение количества РНК при обучении было подтверждено и другими наблюдениями. Так, например, содержание РНК в зрительной коре головного мозга крыс, которые были выращены в темноте, заметно меньше, чем ее содержание у крыс, выращенных на свету. Это указывает, по крайней мере, на усиление клеточного метаболизма и увеличение размера активных нейронов, но не имеет ничего общего с фактическим запасанием информации.

Без белкового синтеза нет и долговременной памяти

Антибиотики, блокирующие трансляцию (рис. 11.6), — пуроминцин, циклогексими́д и ацетоксициклогексими́д, — ингибируют способность к обучению. Большинство исследователей согласны с этим фактом, но не сходятся в его интерпретации. Подавление

биосинтеза белка влияет на функцию большого числа разнообразных ферментов, транспортных белков и других веществ, поэтому амнезия может быть вторичным результатом общего метаболического ингибирования. Циклогексимид тормозит обучение при концентрации, близкой к LD_{50} , а для других антибиотиков, например пуромицина, описаны побочные эффекты, которые могли бы дать объяснение ингибированию. Кроме подавления белкового синтеза пуромицин увеличивает электрическую активность гиппокампа; предполагается, что пептидил-производное пуромицина, а не сам пуромицин, взаимодействует с адренэргическими синапсами. Пуромицин вызывает набуха-

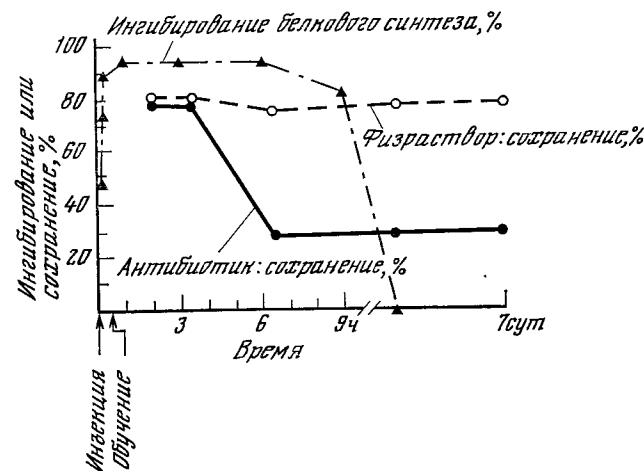


Рис. 11.7. Синтез белка и обучаемость. Сразу после инъекции в мозг мыши антибиотика ацетоксициклогексимида синтез белка блокировался более, чем на 90% (1). Тем не менее мышь обучалась, выучивала задание, но забывала его через 3 ч (2). Контрольный опыт (3): при инъекции солевого раствора вместо раствора антибиотика мыши запоминали задание на много дней [15]. (Воспроизводится с разрешения.)

ние митохондрии, стимулирует деградацию гликогена и напминает в структурном отношении (как производное аденозина) вторичный мессенджер сАМР. Поэтому это не очень подходящий реагент для исследования механизма обучения.

Использование антибиотиков полезно в другом отношении, именно в определении различий между долговременной и кратковременной памятью [15]. Барондес показал, что ацетоксициклогексимид в дозах, блокирующих 90% биосинтеза белка, серьезно не влияет на способность к обучению у мышей, которые, однако, забывают все усвоенное уже через несколько часов (рис. 11.7). Очевидно, антибиотик мешает переводу ин-

формации, полученной при обучении, в долговременную память, но не ее восприятию и временному сохранению кратковременной памяти. Другие исследователи нашли, что уабаин, ингибитор Na^+ , K^+ -АТФазы, подавляет кратковременную память. Согласно Барондесу, критическое значение относительно времени обучения имеет момент инъекции антибиотика. Ингибирование белкового синтеза во время или после обучения практически не влияет на конечный результат, но до обучения оно предотвращает превращение накопленной информации в долговременную память (рис. 11.8).

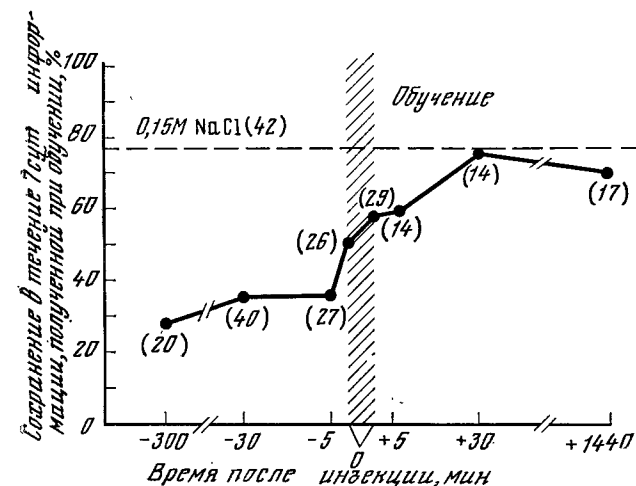


Рис. 11.8. Синтез белка и обучаемость. Если синтез белка блокируется во время или после обучения мыши, его действие на память минимально. Если же белковый синтез блокируется до обучения, почти все забывается за 7 дней [15]. (Воспроизводится с разрешения.)

Таким образом, уже с упомянутыми оговорками можно сделать следующий вывод: имеются различные стадии и различные механизмы памяти — долговременная память, зависящая от белкового биосинтеза, и кратковременная память, которая каким-то образом связана с уабаинчувствительным ионным насосом. Довольно часто постулируется еще дополнительная стадия — сверхкратковременная память, имеющая электрофизиологическую природу.

Поиск белков, специфичных для памяти: S-100 и другие белки

Участие синтеза белка в долговременной памяти предполагает механизм, основанный либо на росте и реконструкции синапсов, либо на синтезе белков, специфичных для памяти.

Хайден обратил внимание на белок S-100, концентрация которого в определенной области мозга четко возрастала во время обучения. Уже долгое время S-100 известен как нейрон-специфичный белок, в еще более высокой концентрации он был найден в глиальных клетках [16]. Название этого белка произошло благодаря его способности растворяться в 100%-ном по насыщенности растворе сульфата аммония. Это маленький (M 24 000), очень кислый, слабо антигенный белок, преимущественно находящийся в мозге (его концентрация в мозге в 100 000 раз превышает содержание в других тканях), в основном в белом веществе; особенно высока его концентрация в мозжечке. Он также присутствует в периферической нервной системе. Если антисыворотка крысы против S-100 вводится в мозг животного, его способность к обучению значительно уменьшается (рис. 11.9) [17].

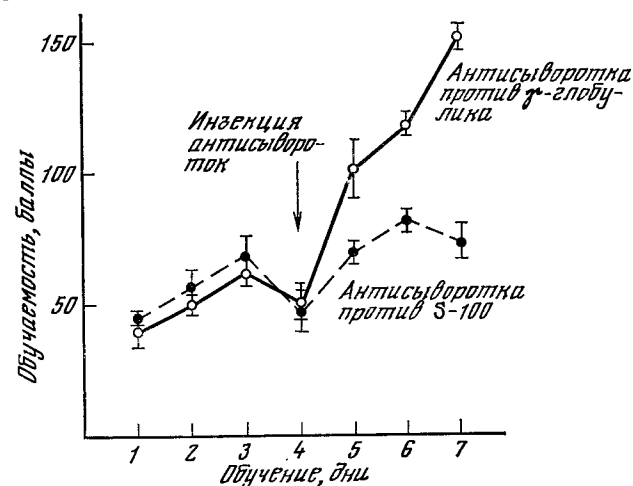


Рис. 11.9. Ингибирование обучаемости антисывороткой против белка S-100. Две группы крыс за дни обучения научились все чаще захватывать пищу определенной лапой. Если одной группе делались инъекции на 4-й день антисывороткой против белка S-100, то этих животных больше ничему научить не удавалось. Другой группе вводилась контрольная антисыворотка против γ -глобулина сыворотки крови. Такие инъекции не влияли на обучаемость [17]. (Воспроизводится с разрешения.)

Аналогичное влияние на долговременную память наблюдалось в опытах с антисывороткой против двух других белков (β M 32 000; γ M 26 000) [20].

С использованием радиоактивного валина было установлено, что эти белки при обучении быстрее синтезируются по сравнению с другими белками. Антисыворотка против фрагментов

синаптической мембраны и ганглиозида G_{M1} блокирует долговременную память, что является еще одним свидетельством важной роли синапса для запасаения информации. Конечно, здесь существуют те же ограничения, что и упомянутые в экспериментах с ингибиторами белкового синтеза.

Общий или специфический эффект?

Многочисленные эксперименты на крысах уже показали, что окружающая среда влияет на рост мозга [19]. На рис. 11.10 приведены параметры, которые заметно увеличиваются, когда крысы содержатся не изолированно в лабораторных клетках

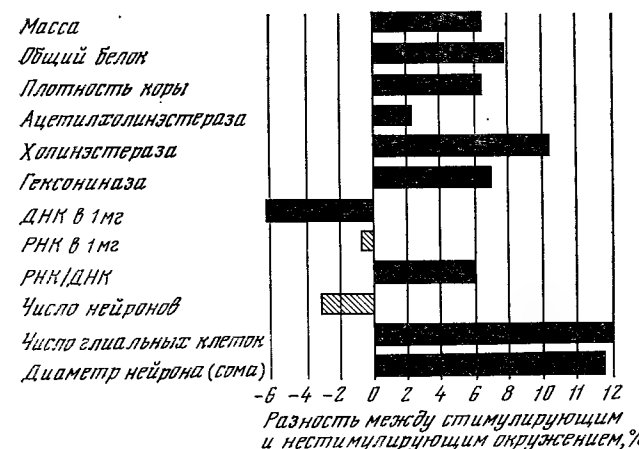


Рис. 11.10. Влияние стимулов окружающей среды на некоторые параметры мозга крыс, помещенных в стимулирующее окружение. Двумя заштрихованными полосками представлены данные, не имеющие статистического значения [19].

в однообразном окружении, а помещаются в обогащенную стимулами среду с «игрушками». Масса мозга и толщина его коры, диаметр клеточных тел нейронов, число глиальных клеток, общий белок РНК и диапазон ферментативной активности выше при наличии стимулирующего окружения. Это следует учитывать при рассмотрении отдельных параметров, сопутствующих процессу обучаемости. Подобным же образом, были описаны морфологические изменения, такие, как увеличение числа и размера дендритных отростков и синаптических контактов, которые только в отдельных случаях могут быть специфическим образом связаны с локализацией в мозге и задачами обучения. В то же время нет сомнений, что эффективность передачи нервного импульса в синапсе играет важную роль при

запасании информации. Убедительные доказательства того, что синапс является центром энграммы, получены в экспериментах с примитивными модельными животными, такими, как *Aplysia*, на которых Кандел и сотр. исследовали изменения в идентифицированных нейронах при привыкании и сенситизации [10].

Сенситизация *Aplysia* — модель обучаемости с описанием состояний от поведения до молекулярных событий

На моллюске *Aplysia californica* [21] механизм «обучаемости» был изучен на всех уровнях: целое животное (поведение), его нервная система (электрофизиология) и молекулярные события (биохимия). Это животное имеет относительно простую центральную нервную систему, состоящую из четырех спаренных и одного единичного ганглия. Оно имеет также относительно простой набор поведенческих рефлексов. Один из них (так называемый «рефлекс втягивания жабры») — защитное втягивание респираторного органа животного жабры в ответ на прикосновение. Для моллюска характерны две простые формы обучения — привыкание и сенситизация; в основе последнего, видимо, лежит описанное выше расслабление (более детально это обсуждается ниже). Нейроны, ответственные за втягивание жабры, локализованы в одном из девяти ганглиев *Aplysia* — абдоминальном ганглии. Нервная система *Aplysia* не только достаточно проста, но она имеет еще одно важное преимущество — необычный размер многих нейронов. Они могут быть легко идентифицированы в каждом единичном образце. Как показано в гл. 12, этим идентифицированным нейронам были присвоены кодовые буквы и номера, а исследования электрофизиологическими методами дали схемы соединений и полное описание простого поведения, как, например, рефлекса втягивания жабры.

Элегантные эксперименты, касающиеся этих вопросов, были проделаны в основном в лаборатории Е. Кандел; они представлены на рис. 11.11. Имеются шесть мотонейронов, иннервирующих жабры. Они возбуждаются (через несколько интернейронов) от 24 сенсорных нейронов, связанных с сенсорными клетками сифона (который также является частью респираторного органа), получающего и передающего осязательный стимул. При длительной повторяющейся стимуляции происходит привыкание. Но здесь мы остановимся на другой схеме: когда осязательный стимул действует не на сифон, а на голову данного организма, наблюдается сенситизация, а не привыкание. Эта сенситизация опосредована интернейронами, использующими серотонин в качестве нейромедиатора.

Как указывалось в гл. 9, рецепторы серотонина связаны с аденилатциклазой и серотонин стимулирует образование сАМР. Согласно общей схеме, представленной на рис. 9.12, все внутриклеточные эффекты циклического АМР, возможно, обусловлены сАМР-зависимыми протеинкиназами, и представляется логичным, что наблюдаемая сенситизация имеет некоторое отношение к фосфорилированию ключевого белка. Предварительные электрофизиологические эксперименты показали, что расслабление основано на продленных потенциалах действия и повышенной секреции медиатора иннервированным сенсорным нейроном. Экзогенный серотонин и блокатор калиевого канала

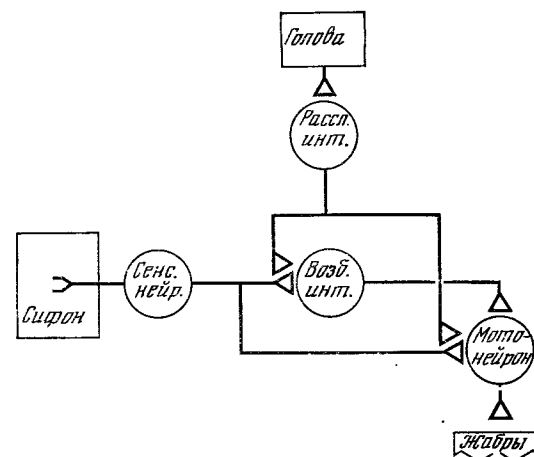


Рис. 11.11. Схема нейронного контура в *Aplysia* при «жабровтягивающем рефлексе». возб. инт. — возбуждающий интернейрон; рассл. инт. — расслабляющий интернейрон; сенси. нейр. — сенсорный нейрон. Некоторые вошедшие в схему нейроны действительно представляют собой группы эквивалентных нейронов. Объяснение см. в тексте [Paric C. G., Castelluci V. F., Kandel E. R., Schwartz J. H. in: Rosen O. M., Krebs E. G. (eds.), Cold Spring Harbor Conferences on Cell Proliferation. Vol. 8, 1361—1375, 1983].

ТЭА действуют подобным же образом. Интересно, что инъекция каталитической субъединицы сАМР-зависимой протеинкиназы в сенсорный нейрон стимулировала расслабление, а инъекция ингибитора протеинкиназы снимала это действие. Кандел и сотр. показали, что серотонин, а также вводимая протеинкиназа вызывают благодаря снижению калиевой проводимости значительное пролонгирование потенциалов действия и это в свою очередь ведет к более длительной деполаризации нервных окончаний и увеличению входящего Ca^{2+} -тока. Более высокая концентрация Ca^{2+} в нервном окончании вызывает более интенсивное высвобождение медиатора, т. е. более эффективную

химическую передачу нервных импульсов от сенсорных к двигательным нейронам. Молекулярная картина поведения *Aplysia* и ее обучаемости была завершена после того, как открыли, что фосфорилирование отдельного мембранного белка с M 137 000, возможно калиевого канала, идет под действием серотонина через cAMP и cAMP-зависимую протеинкиназу. Молекулярная модель рефлекса втягивания жабр *Aplysia* изображена на рис. 11.12. Подобные эффекты, сопряженные с фосфорилирова-

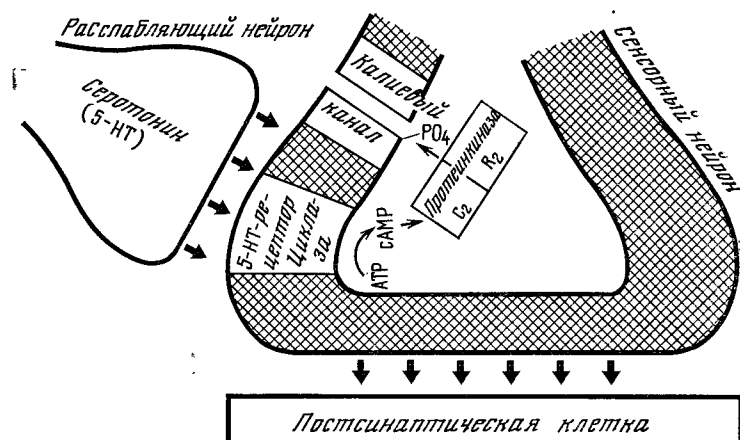


Рис. 11.12. Модель молекулярного механизма, лежащего в основе пресинаптического расслабления «рефлекса втягивания жабры» в *Aplysia* (С некоторыми изменениями схемы взята из работы [Paric C. G., Castelluci V. F., Kandel E. R., Schwartz J. H., in: Rosen O. M., Krebs E. G. (eds.), Cold Spring Harbor Conferences on Cell Proliferation, Vol. 8, p. 1373, 1983]. Объяснения в тексте.

нием калиевых каналов, были показаны на многих клетках; специфическая природа K^+ -канала может меняться, и в некоторых случаях каналы активируются, а в других — ингибируются. Общим, однако, является то, что фосфорилирование белка может регулировать электрическую активность нервных (и мышечных) клеток и таким образом изменять поведение.

Модель на рис. 11.12 всего лишь гипотетическая (хотя и вероятная) и наблюдаемый параллелизм между фосфорилированием и изменением поведения, возможно, и не определяет причинных связей.

Принимают ли участие в процессе обучения катехоламины, ацетилхолин и гормоны гипофиза?

Катехоламинэргические антагонисты имеют отношение к обучению и памяти, агонисты могут стимулировать функцию памяти. Амфетамин, а также адреналин, норадреналин и допамин

благоприятно влияют на выработку условного рефлекса. В то же время катехоламины играют не такую уж важную роль и действуют скорее как модуляторы обучаемости и памяти. То же самое может быть сказано об ацетилхолине. Антиацетилхолинэстеразные вещества (например, физостигмин) нейтрализуют ингибирование обучаемости, вызываемое скополамином. Однако значимость этих исследований весьма ограничена, так как амфетамин, скополамин и другие соединения также влияют на восприятие и это не может быть отделено от самих процессов обучаемости и запоминания.

АСТН (АКТГ) и другие гормоны гипофиза также участвуют в процессах обучаемости [13]. Гипофизэктомия приводит к серьезным нарушениям в обучаемости, которые можно преодолеть, вводя АСТН. Возникает вопрос, как гормон с таким широким спектром действия может быть достаточно селективен для столь специфической функции как обучаемость?

Следует постулировать, что гормон может действовать только на нервные пути, которые прямо влияют на обучаемость. В любом случае обучаемость не может рассматриваться как простой унифицированный механизм, а представляет собой область перекрывающихся и взаимодействующих факторов.

Выводы

Специфичность и пластичность — два основных свойства нервной системы, которые требуют объяснения на молекулярном уровне. В основе дифференциации нейрона и правильного сопряжения нейронной сети должны лежать генетическая программа, однако она должна быть достаточно гибкой, а результат в целях необходимой адаптации достаточно пластичным.

В период эмбрионального развития принимается множество решений: нейрон или глиальная клетка; адренэргическая, холинэргическая или другая система рецептора нейромедиатора; развитие синапса или нет; нейрохимия ищет соответствующие сигналы дифференциации. На автономных глиальных клетках было показано, что трофический фактор способствует холинэргическому — адренэргическому переключению.

Трофические факторы исключительно важны для образования и выживания нервной системы. Они могут быть белками, ионами (Ca^{2+} , Na^+ , K^+ или др.), нейромедиаторами или гормонами. Наилучшим образом изучен фактор роста нерва (NGF) — белок, стимулирующий рост нейритов в ганглии, активирующий ферменты (например, тирозингидроксилазу) и необходимый для выживания симпатической нервной системы.

Синаптогенез хорошо изучен при образовании нейромышечного синапса. Он не зависит от слияния миобластов с образо-

ванием миотрубочек, на него не влияет ни медиатор, ни наличие активных рецепторов или Ca^{2+} , ни электрическая активность участвующих клеток. Его механизм пока остается загадкой; гипотезы временно замещают факты. Возможная гипотеза предполагает генетически запрограммированный рост аксонных групп, при селективной стабилизации один из временно образованных контактов с клеткой-мишенью фиксируется с образованием функционального синапса. Согласно гипотезе Сперри, путь роста аксона (иногда много сантиметров) прокладывается с помощью химического градиента, согласно другим гипотезам — микрофиламентами. При этом могут участвовать специальные белки, ламинин или факторы адгезии (N-CAM).

Небольшое известно и о пластичности зрелой нервной системы, о привыкании и условных рефлексах, об обучаемости и памяти. Кроме всего прочего, синапс обсуждается как участок пластичности. Обучаемость не зависит от синтеза ДНК, но сопряжена с синтезом РНК и белков. Долговременная и кратковременная память различаются в экспериментах с использованием антибиотиков: только в случае долговременной памяти необходим синтез белка. Подобным образом, антисыворотка против S-100 и некоторые белки, специфичные для мозга, блокируют способность к обучению. Нет специальных молекул памяти; в основном белковый синтез обеспечивает обычный рост нервной клетки или ее синапсов, активированных при обучении. Из всех нейромедиаторов только катехоламины и ацетилхолин (но не серотонин) имеют отношение к обучаемости, причем гормон гипофиза АСТН в этой связи играет особую роль.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. *Patterson P. H.*, Environmental determination of autonomic neurotransmitter functions, *Ann. Rev. Neurosci.*, **1**, 1—17 (1978).
2. *Patrick J., Heinemann S., Schubert D.*, Biology of cultured nerve and muscle, *Ann. Rev. Neurosci.*, **1**, 417—443 (1978).
3. *Thoenen H., Schwab M., Otten U.*, Nerve growth factor as a mediator of information between effector organs and innervating neurons, *Symp. Soc. Dev. Biol.*, **35**, 101—118 (1978).
4. *Spitzer N. C.*, Ion channels in development, *Ann. Rev. Neurosci.*, **2**, 363—397 (1979).
5. *Yankner B., Shooter E. M.* The biology and mechanism of action of Nerve Growth Factor, *Ann. Rev. Biochem.*, **51**, 845—868 (1982).
6. *Berg D. K.*, New neuronal growth factors, *Ann. Rev. Neurosci.*, **7**, 149—170 (1984).
7. *Hamprrecht B.*, Neuronenmodelle, *Angew. Chem.*, **88**, 211—213 (1976).
8. *Changeux J. P., Danchin A.*, Selective stabilisation of developing synapses as a mechanism for the specification of neuronal networks, *Nature*, **264**, 705—712 (1976).
9. *Gottlieb D. I., Glaser L.*, Cellular recognition during neural development, *Ann. Rev. Neurosci.*, **3**, 303—318 (1980).

10. *Kandel E. R.*, Cellular Basis of Behavior, W. H. Freeman and Company, San Francisco, 1976.
11. *Thompson R. F., Berger T. W., Madden J.*, Cellular processes of learning and memory in the mammalian CNS, *Ann. Rev. Neurosci.*, **6**, 447—491 (1983).
12. *Reinis S., Goldman*, The Chemistry of Behavior, Plenum Press, New York & London, 1982.
13. *Dunn A.*, Neurochemistry of learning and memory: An evaluation of recent data, *Ann. Rev. Psychol.*, **31**, 343—390 (1980).
14. *Lynch G., Baudry M.*, The biochemistry of memory: a new and specific hypothesis, *Science*, **224**, 1057—1063 (1984).
- 14a. *Eccles J. C.*, The Understanding of the Brain, 2nd edition, McGraw-Hill, New York, 1977.
15. *Barondes S. H.*, Multiple steps in the biology of memory. In: The Neurosciences, Schmitt, F. O. (ed.). The Rockefeller University Press, New York, 1970.
16. *Bock E.*, Nervous system specific proteins, *J. Neurochem.*, **30**, 7—14 (1978).
17. *Hyden H., Lange P. W.*, Protein changes in nerve cells related to learning and conditioning. In: The Neurosciences, Schmitt F. O. (ed.), The Rockefeller University Press, New York, 1970.
18. *Dudel J., Kuffler S. W.*, Presynaptic inhibition at the crayfish neuromuscular junction, *J. Physiol.*, **155**, p. 514, 531 (1961).
19. *Rosenzweig M. R., Bennet E. L., Diamond M. C.*, Brain changes in response to experience, *Sci. Am.*, **226**, 22 (1972).
20. *Shashoua V. E.*, Brain protein metabolism and the acquisition of new patterns of behavior, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 1743—1747 (1977).
21. *Paris C. G., Castelluci V. F., Kandel E. R., Schwartz J. H.*, Protein phosphorylation, presynaptic facilitation, and behavioral sensitization in *Aplysia*, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **48**, 1361—1375 (1983).

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА

- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. D.*, Molecular Biology of the Cell, Garland Publishing, Inc., New York, London, 1983.
- Spitzer N. C.*, Neuronal Development, Plenum Press, New York, London, 1982.
- Molecular Neurobiology*, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **48**, 1983.
- Edelman G. M.*, Cell adhesion and the molecular processes of morphogenesis, *Ann. Rev. Biochem.*, **54**, 135—169 (1985).
- Seifert W.* (ed.), Neurobiology of the Hippocampus, Academic Press, London, 1983.
- См. также работы [4, 10, 11, 14] в разд. «Цитированная литература».

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МОДЕЛЬНЫЕ СИСТЕМЫ

Наверное, всем понятно, что конечная цель нейробиологических исследований состоит в познании мозга человека, и, естественно, в установлении различий между здоровым мозгом и мозгом при разного рода заболеваниях. По вполне понятным причинам возможности эксперимента на мозге крайне ограничены и поэтому при исследованиях разнообразных аспектов нейрональной активности следует использовать модели. В предыдущих главах уже приводились примеры модельных систем; некоторые, самые важные, мы вновь рассмотрим в этой главе. Из рассмотрения исключены теоретические модели — кинетические и математические — для интерпретации функций мозга. В гл. 3 и 7 можно прочесть о биофизических экспериментальных моделях, таких, как искусственная липидная мембрана или светозависимый протонный насос галофильных бактерий. Здесь же представлены некоторые биологические системы, моделирующие определенные свойства, часто в преувеличенном виде, но в соответствии с их прототипами, в других отношениях модели могут значительно отличаться от прототипа. Таким образом, как правило, экспериментальные модели дают информацию только об одной из функций прототипа и к полученным результатам следует относиться с большой осторожностью. Объединенные данные изучения нескольких моделей естественно лучше отражают картину (хотя опять же это всего только модель) реально существующего явления. История нейробиологии, как и науки вообще, является историей предложенных, отвергнутых и уточненных моделей.

Без использования гигантского аксона кальмара наше понимание генерации потенциала действия не продвинулось бы так вперед (рис. 12.1) [1, 2]. Аналогично, нейромышечное соединение (рис. 12.2) — это классическая экспериментальная модель синаптической передачи [1, 2]. Простые нервные системы пиявки (*Hirudo*) и морского моллюска (*Aplysia*) (рис. 12.3) — ценные модели изучения физиологии поведения [3] (гл. 11). При изучении поведения этих животных, например способности плавать у пиявки и рефлекса втягивания жабры у *Aplysia*, удалось идентифицировать нейроны, обуславливающие

данные функции и представить их как активность определенных нейронных контуров. Идентичность этих нейронов и контуров в многочисленных организмах доказывает, что они генетически детерминированы. Такие свойства, как привыкание, сенситизация и условный рефлекс, влияющие на основные поведенческие характеристики *Aplysia*, могут изучаться с целью моделирования обучаемости и памяти; исследования были проведены на всех уровнях: целый организм, клеточный и молекулярный уровни (гл. 11).

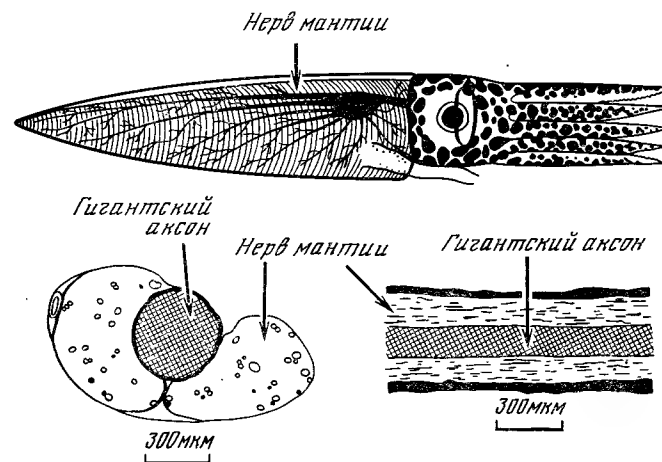


Рис. 12.1. Кальмар и его гигантский аксон диаметром до 500 мкм [14] служили предпочтительным материалом для электрофизиологических исследований, в частности ионной основы потенциала покоя и потенциала действия и его распространения (см. также гл. 5) [14].

В нейробиологии развития в качестве экспериментальных моделей используются, например, амфибии, целые эмбрионы цыплят или экплантаты ткани, культивируемые *in vitro*. Они особенно ценны для идентификации факторов, определяющих специфичность нейрональных соединений, что очень хорошо исследовано на зрительных системах различных организмов, например классические эксперименты Сперри по реимплантации глаз после оптического вращения и работа на культивированных клетках ганглия сетчатки, где были определены поверхностные маркеры, гарантирующие правильность взаимосоединений. В гл. 1 приводится еще один пример: элегантный анализ, проведенный Хубель и Визель, по обработке зрительной информации в еще более сложной экспериментальной системе — зрительной коре котенка.

Ведется поиск модельных систем многих заболеваний нервной системы. Мы уже отмечали в гл. 9 многообещающую модель для изучения *миастении*. Очищенный ацетилхолиновый рецептор, введенный экспериментальному животному, вызывает характерные симптомы; считают, что в основе заболевания лежит иммунный ответ на этот рецепторный белок. *Рассеянный склероз* можно имитировать инъекциями очищенного основного белка миелина. Оба этих заболевания классифицируются в настоящее время как аутоиммунные. *Scrapie* (гл. 4) может служить моделью нескольких неврологических заболеваний, например болезни Крейтцфельда — Жакоба и, возможно, болезни Альцгеймера. Конечно, невозможно найти у животных подходящие психиатрические модели, имитирующие сознание человека, но они пригодны для изучения действия нейропсихофармакологических лекарств. Последующее изложение не является исчерпывающим обзором модельных систем, а только описанием немногих моделей, где возможен биохимический анализ.

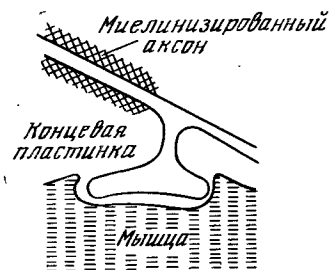


Рис. 12.3. Нейромышечная концевая пластинка. Модельная система синаптической передачи.

Хемотаксис

«Что применимо к *E. coli*, применимо и к слону». Было бы очень хорошо, если бы это старое кредо молекулярной генетики можно было перенести и в нейробиологию. Впрочем, вполне допустимы определенные аналогии между нервной системой высших форм жизни и механизмом влияния факторов окружающей среды на микроорганизмы. Такие аналогии могут привести к ин-

тересным обобщениям. Возможно, существует некий универсальный принцип передачи сигнала и обработки информации, сравнимый с универсальным генетическим кодом. Но включение одноклеточных организмов в «нейронауку» может иметь и практическое значение, упростив эксперименты при использовании бактерий вместо ткани. Микроорганизмы особенно полезны для генетических исследований, так как время размножения у них короче, чем у высших животных, кроме того, могут быть выделены мутанты, изменение поведения которых можно сопоставить с изменениями биохимических характеристик.

Одноклеточные организмы не имеют «нервной системы», но тем не менее воспринимают информацию из окружающей среды. Они обрабатывают информацию, собирают ее и переда-

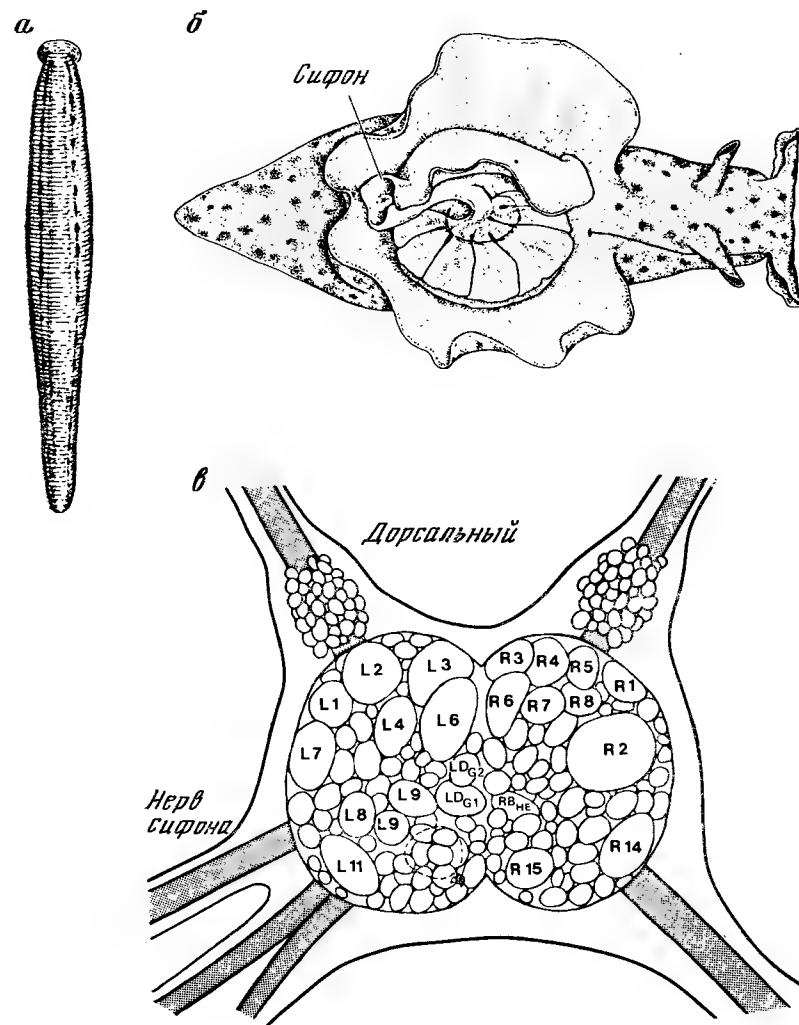


Рис. 12.3. Простые нервные системы с идентифицированными нейронами. Пиявка (*Hirudo*) (а) и морской моллюск (*Aplysia*) (б) — модельные системы для изучения взаимосвязей поведения и соединения контуров нервной системы; в — нейроны, идентифицированные в ганглии *Aplysia*. Обозначенные (и некоторые другие) клетки можно идентифицировать в отдельных образцах по их положению и размеру. L — перед номером означает левый, а R — правый (по Канделу).

ют на молекулярные структуры, которые вызывают реакции или изменение поведения организма.

Хемотаксис в бактериях хорошо исследован и является очень интересным поведенческим явлением [4]. В 80-х годах прошлого века Энгельман и вскоре после него Пфедфер наблюдали, что бактерии плывут в направлении капилляра, содержащего питательные вещества, получая, следовательно, информацию («питание») и превращая ее в конкретное действие («поведение»). Напротив, они уходят прочь от токсичного соединения. Этот процесс, называемый хемотаксисом, широко изучался, и на нем детектировались многие функциональные элементы нервной системы: обучаемость, память, принятие решений и способность оценивать ситуацию.

Посредством хемотаксиса бактерии реагируют на широкий спектр соединений, молекулы которых взаимодействуют с клеточной стенкой и таким образом влияют на орган движения бактерий — жгутики. Они двигаются «вдоль» градиента питательного вещества (или против градиента репеллента) путем регулирования двух фаз движения, что в норме представляет собой медленное продвижение вперед, затем остановка, беспорядочное движение и снова медленное движение в новом направлении. Когда бактерия, чтобы ориентироваться в направлении движения, «чувствует» градиент, хемотаксис проявляется как простое продолжение движения в том же направлении.

Рецепторы — те органы, которые «чувствуют» питательное вещество. Имеются два типа рецепторов; один из них, состоящий из растворимых белков, находится в периплазматическом пространстве, другой включает интегральные белки внутренней мембраны. Некоторые из этих белков были выделены и биохимически охарактеризованы. Мальтоза, рибоза и галактоза связываются с определенными растворимыми рецепторами, названными мальтозасвязывающим белком (MBP), рибозасвязывающим белком (RBP) и галактозасвязывающим белком (GBP). Эти растворимые рецепторы имеют M 30 000. Аспартат связывается с tag_1 -рецептором, серин — с tsr -рецептором (M 60 000).

Хотя рецепторы сигналов хемотаксиса, таких, как рибоза и галактоза, очевидно, являются частью мембранной транспортной системы сахаров, транспорт и метаболизм молекулы возникают не как следствие химического ответа. После связывания с лигандом рецептор, по-видимому, претерпевает конформационное изменение. Оно и регулирует действие жгутиков ферментативным или электрическим способом. Приняв хемотаксис как модель проведения и обработки внешних сигналов, особенно важно, что рецептор рибозы не связывает галактозу, но галактоза все же ингибирует хемотаксический ответ на рибозу (*vice versa*). Конкуренция двух углеводов не происходит на уров-

не рецепторных связывающих центров. Исходя из вышесказанного и данных, полученных при изучении мутантов, Кошланд и др. предложили следующую модель (рис. 12.4): различные стимулы приводят к конформационным изменениям в соответствующих рецепторах, многие из которых конкурируют в «центральной обрабатывающей системе», что приводит к наложению многих стимулов всего в нескольких точках, интегрирующих входящие сигналы. Таким образом, RBP и GBP конкурируют за мембранно-связанный рецептор, называемый trg . Эта ситуация напоминает систему рецептор — циклаза (гл. 9), где также имеется схождение сигналов на общем передаточном факторе — N-белке (G-белке), который соответствует trg в нашем случае.

Эта схема весьма предположительна, но подтверждается большим числом генетических и биохимических экспериментов. Были выделены многие связывающие белки (рецепторы), обнаружены их предполагаемые конформационные изменения, выяснена молекулярная основа «системы обработки». Адлер и сотр. показали, что белки бактериальных мембран подвергались ферментативному метилированию — важная стадия хемотаксического взаимодействия. Итак, в отсутствие метильного донора — метионина, бактерии все-таки подвижны, но их движение уже не направлено к питательному веществу. Метионин активируется АТФ до S-аденозилметионина (SAM) (рис. 12.5), активированная метильная группа которого переносится на карбоксильную группу остатков глутаминовой кислоты мембранно-связанных рецепторов. Реакция катализируется метилтрансферазой. Мутантные формы, не имеющие фермента, плывут целенаправленно. Метильные группы удаляются ферментом метилэстеразой; мутанты, не обладающие данным ферментом, все время двигаются беспорядочно. Наблюдалось, что метилирование мембранно-связанных белков характерным образом меняется в зависимости от того, является ли хемотаксический стимул аттрактантом (питательным веществом) или репеллентом.

Это — далеко не полная схема. Рецепторы многих стимулов, перечисленных слева на рис. 12.4, не идентифицированы или не выделены, природа продуктов гена A, W, Y и S не выяснена и механизм преобразования сигнала в движение жгутиков требует дальнейшего исследования.

Дополнительную информацию об этом и о движении жгутиков можно найти в специальной литературе. Мы же вернемся к аналогии с нервной системой высших животных. Хемотаксические бактерии способны «воспринимать» (т. е. имеют рецепторы), «распознавать» (различные рецепторы для различных стимулов) и «отбирать» (между противоположными стимулами). Они даже могут «обучаться», например биосинтез рецеп-

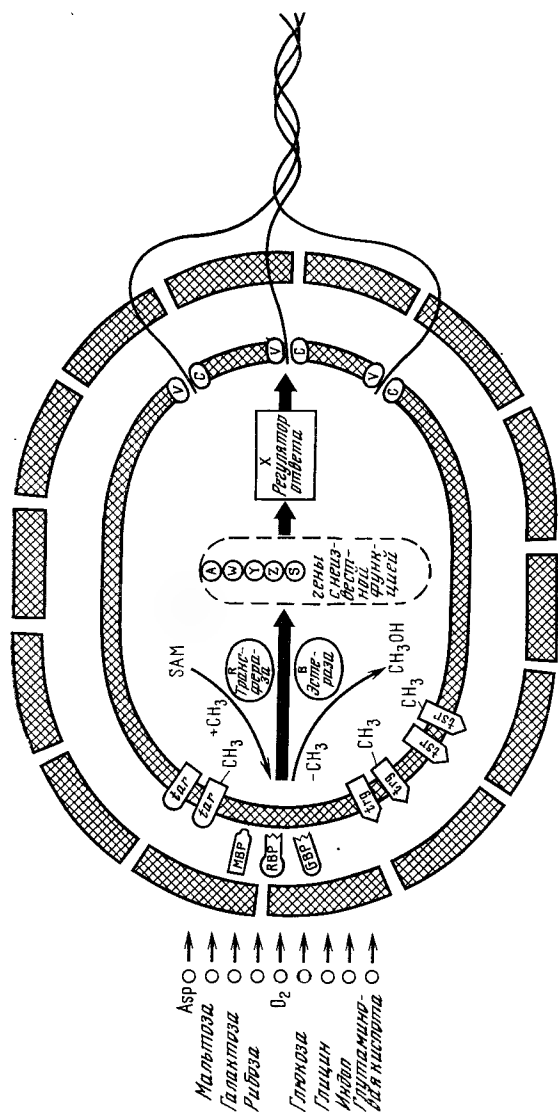


Рис. 12.4. Схема батарей чувствительной системы. Разнообразные химические эффекторы (O_2 , аспартат, глюкоза и др.) могут проникать через поры наружной мембраны и взаимодействовать с рецепторами в периплазматическом пространстве (GPR — белок, связывающий рибозу; MBR — белок, связывающий мальтозу) и с мембранно-связанными рецепторами (tag для аспартата, tag для серина). Мембранно-связанные молекулы метилируются продуктом гена *cheR*, который использует S-аденозилметионин (SAM), и деметилируются продуктом гена *cheB*. Цитоплазматические пептиды, кодируемые генами A, S, W, Z и Y, как известно, играют важную роль в обработке сигнала, но их специфическая функция пока неизвестна. Полагают, что они совместно с R и B контролируют уровень регулятора ответа X. Ген *cheC* в жгутиках является сигнальным детектором, который регистрирует уровень X и передает информацию жгутикам. Ген *cheV* также участвует в передаче этой информации, хотя пока и неясно, как именно [4a]. (Воспроизводится с разрешения.)

торов рибозы может быть вызван подходящей культуральной средой, и бактерия, таким образом, становится чувствительной к рибозе. Кошланд провел аналогию еще дальше, когда сказал, что бактерии обладают своеобразным «инстинктом», поскольку с помощью некоторых рецепторов на идентичные стимулы они всегда будут реагировать одинаково. Они также имеют «память» на стимулы, продолжительность которых соответствует продолжительности движения. Таким образом, при постоянном действии повышенной, но однородной концентрации питательного вещества реакция движения угасает, т. е. бактерия реагирует на сигнал «увеличение концентрации», но «забывает» его через некоторое время (привыкание). Аналогия между моделью хемотаксиса бактерии и механизмом стимуляции в нервных клетках прослеживается и на молекулярном уровне. Недавно удалось обнаружить функциональное метилирование с помощью SAM в нейрональных клеточных мембранах.

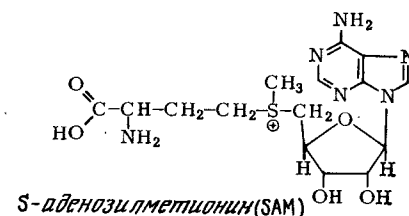


Рис. 12.5. Обработка сигнала в бактерии при хемотаксисе сопровождается метилированием рецепторов внутренней мембраны. Метилирование посредством метилтрансфераз осуществляется благодаря активной метильной группе S-аденозилметионина (SAM). В высших организмах фосфорилирование и метилирование белков принимают участие в обработке сигнала на молекулярном уровне.

Хемотаксис происходит и в нематодах [5] — червях, нервная система которых состоит из ~300 нервных клеток. В такой простой системе можно исследовать поведение, и, используя мутантные организмы, определить его клеточную и молекулярную основу. Рассмотрим растения в качестве доказательства того, что универсальные принципы рецепции стимулов и обработки сигналов были заложены еще на ранних стадиях эволюции: хемотаксис наблюдается и на гаметах бурых водорослей [6], которые узнают половые аттрактанты в морской воде и плывут к ним. Здесь же следует упомянуть слизистые грибы *Sicyostelium discoideum*, рост колоний которых регулируется cAMP, высвобождающегося в среду.

Модель поведения: парамеция

Рассматривая одноклеточные модели, перейдем от прокариотов к эукариотам; парамеция имеет много общих свойств с нервной клеткой и используется в качестве модели по следующим причинам [5]: она имеет мембрану, которую можно электрически стимулировать (т. е. высвобождается потенциал действия); обладает простым «поведением»; можно получить мутантные формы с измененным поведением и отобрать мембранные мутанты; она может быть клонирована и культивирована в больших количествах.

Интересная мутантная парамеция названа «пешкой» по аналогии с пешкой из игры в шахматы. Дикий тип меняет направление движения на обратное, когда встречает препятствие, а «пешка» может плыть только вперед (рис. 12.6). Сейчас известно, что обратное движение есть результат притока ионов кальция, который следует за стимулом. Этот вход кальция воздействует на двигательный механизм жгутиков, так что некоторое время они действуют в противоположном направлении. У «пешки» кальциевый канал изменен и ионы Ca^{2+} не попадают в него. Другой мутантный организм, как и дикий тип, меняет направление движения, но продолжает плыть в обратном направлении иногда несколько минут. Это происходит из-за мутации одного из типов ионных каналов клеточной мембраны, которых здесь идентифицировано больше, чем в нейронах.

Модель биологии развития: гидра

Примером эволюционно первой формы жизни, имеющей нервную систему, является гидра (*Hydra*) — маленький полип, живущий в пресной воде. Организм гидры состоит из двух клеточных слоев, эктодерма и энтодерма, и имеет только пять типов клеток, включая нервные клетки. Вследствие такого простого строения гидра стала подходящей моделью для исследования дифференциации и развития [7]. Были выделены молекулы, которые стимулируют образование головных клеток из недифференцированных клеток, и молекулы, продуцирующие клетки конечностей. «Головные активаторы» и «активаторы конечностей» являются пептидами небольшого размера, присутствующими в нервных клетках (при определенных условиях и в эпителиальных клетках [8]), не исключено, что они являются предшественниками нейропептидов. Кроме того, нервные клетки содержат ингибиторы не пептидной природы и более низкой молекулярной массы. Эти морфогенные соединения, видимо, посредством образования градиента в организме регулируют специфичность различных клеточных районов.

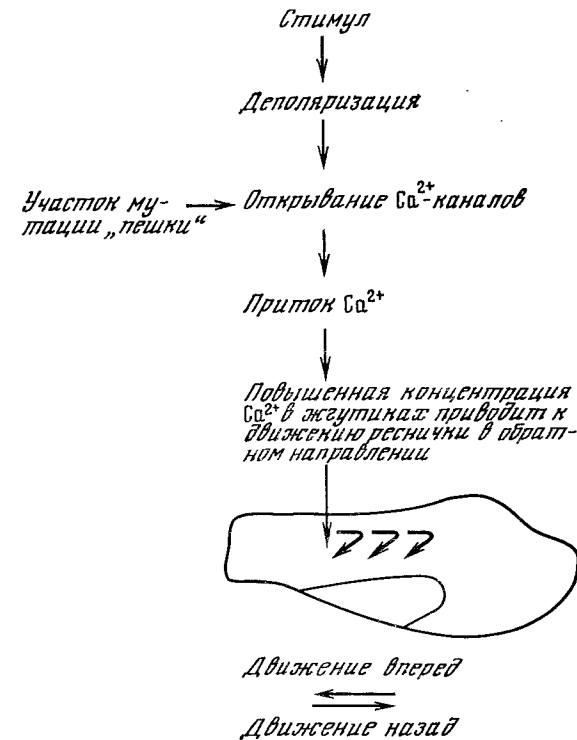


Рис. 12.6. Парамеция — модельная система поведения на молекулярном уровне. Организм с измененным поведением — «пешка», как и пешка в шахматах, может двигаться только вперед; причиной отклонения в поведении является дефект кальциевого канала. После возбуждения мембраны путем столкновения с препятствием эти каналы не открываются, как у дикого типа. Таким образом, необходим вход кальция в клетку для обращения движения жгутиков. Были открыты и другие мутантные организмы с дефектными ионными каналами.

Дрозофила

Нейробиологи, по аналогии с классической модельной системой генетиков — *E. coli*, надеялись, что плодовая мушка дрозофила послужит им также успешно в качестве модельной системы. Имя мушки *Drosophila* или «любящая росу» указывает на особенность ее поведения: она имеет биологические «часы» с 24-часовым ритмом и особенно активна на рассвете. Имеются мутации с 19- и 28-часовыми ритмами, а также мутант, вообще не имеющий ритма и активный целый день. Было выделено много других точечных мутаций, влияющих на движение, зрительную память и половое поведение. Всего известно более

2000 видов, из которых особенно интересен гибрид самца и самки.

Организмы с точечными мутациями появляются в результате мутации единичного гена, и, таким образом, отдельного белка. Следовательно, сложное поведение может быть анализировано на уровне белков. Кроме хорошо изученной генетики дрозофила имеет следующие преимущества: короткое время воспроизводства, легкость селекции, они достаточно дешевы (маленькие организмы, необходима малая площадь), безвредны и имеют несколько, но огромных хромосом. Из них уже был выделен ацетилхолиновый рецептор. Нейроны дрозофилы слишком малы для электрофизиологических исследований, но мышечные волокна позволяют изучать нейромышечную синаптическую передачу. Один мутант при анестезии делает необычные ритмические движения лапкой. Причина кроется в изменении потенциалзависимого калиевого канала, который обычно реполяризует мотонейрон после потенциала действия, блокируя передачу импульса. Здесь снова, как и в случае мутанта парамеции «пешки», в основе изменения поведения лежит модификация белка ионного канала возбудимой мембраны.

Известны мутантные дрозофилы с хорошо определенным дефектом памяти. Для некоторых это связано с нарушением метаболизма cAMP, другие, видимо, дефектны из-за изменения уровня моноаминов. Учитывая, что генетика дрозофилы прекрасно разработана, этот организм становится все более важным при исследовании памяти.

Генетика мутантных мышей как метод анализа двигательной активности

Мутантные мыши [5, 9] *Weaver* (wv), *Reeler* (rl), *Staggerer* (sg) и *Nervous* (nr) обеспечили продвижение на пути познания контроля за движением. Все они имеют мутации нервных соединений мозжечка [9], который осуществляет контроль за движением животных. С помощью таких мутантов стало возможным исследование взаимосвязи между генетической программой и клеточным окружением при образовании сети нейронов, поскольку при этом удастся идентифицировать не только точное место мутации, но и изменения структуры и синаптических контактов других клеток функциональной единицы (рис. 12.7).

Мозжечок состоит из клеток только нескольких типов, связанных стереотипным образом. Имеются две афферентные системы, выходящие и моховидные волокна, и одна эфферентная система, клетки Пуркинье, характеризующиеся дендритными разветвлениями. Выходящие волокна образуют прямые синаптические контакты с дендритами клеток Пуркинье, моховидные

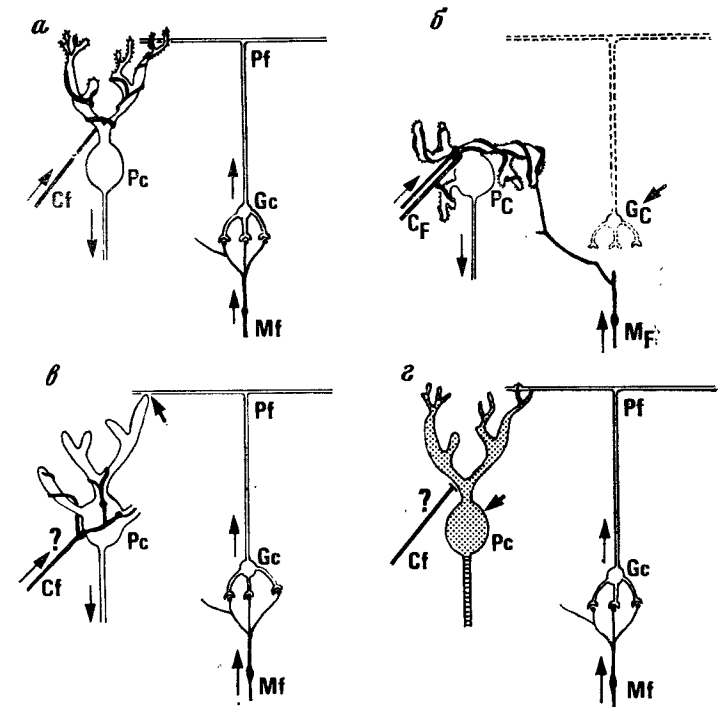


Рис. 12.7. Мутантные мыши — модельные системы дисфункции поведения в результате нарушения развития. Четыре мутации, влияющие на нейрональную сеть мозжечка и вызывающие изменения двигательного поведения: Pc — клетка Пуркинье; Gc — гранулярная клетка; Mf — мохообразное (афферентное) волокно; Cf — выходящее (афферентное) волокно; Pf — параллельное волокно (афферентное к клетке Пуркинье). а — нормальная кора мозжечка: три афферентных отростка к клетке Пуркинье. Суммарные импульсы проводятся только одним эфферентом; б — мутантная мышь *Weaver*: отростки мохообразного волокна подходят прямо к клетке Пуркинье, поскольку гранулярные клетки погибли при развитии. Это приводит к изменению клетки Пуркинье и ее иннервации выходящими волокнами; это и есть доказательство того, что точечная мутация (влияющая на гранулярные клетки) при изменении среды генетически изменяет нормальные нейроны и синапсы; в — мутантная мышь *Staggerer*: здесь центром мутации является клетка Пуркинье, которая не образует шипов на дендритах; г — мутантная мышь *Nervous*: после нормального развития клетки Пуркинье дегенерируют. До сих пор был найден только один ген, кодирующий мутацию, — это белок P₄₀₀, чья функция, однако, неизвестна [9]. (Воспроизводится с разрешения Sotelo и North Holland)

волокна — не прямые контакты через промежуточные передающие системы или гранулярные клетки.

Мыши *Weaver* не имеют гранулярных клеток, погибающих рано при онтогенезе и, следовательно, не мигрирующих в предназначенное для них место в коре мозжечка. Хотя мутация

влияет только на гранулярные клетки, изменения происходят и в других клетках, чье окружение меняется в отсутствие этих клеток. Отсюда ясно, как важен анализ поведенческих мутантов. Моховидные волокна образуют синапсы с клетками Пуркинье, поскольку их мишени, гранулярные клетки, отсутствуют. Дендритное дерево клеток Пуркинье изменяет форму, и особенно интересно, что в мозжечке *Weaver* имеется не одно, а два выходящих волокна, осуществляющих с ним синаптический контакт. Это изменение активности, очевидно, обуславливает нарушение селективной стабилизации (гл. 11) и регрессию лишних волокон. Результатом всех этих изменений системы контактов мозжечка является нарушение поведения мышей *Weaver*.

Аналогичные причины лежат в основе и других мутантных проявлений. Однако еще не найдены гены, ответственные за мутации и их функции. Мы уже упоминали отсутствие специфического белка мозжечка P-400 у мышей *Staggerer* и *Nervous* (гл. 10). Еще один важный момент анализа поведения заключается в том, что модель такого типа позволяет анализировать генетические причины «ненормального» поведения при заболеваниях нервной системы человека. Мы уже описали несколько наследственных заболеваний нервной системы человека (например, болезни липидного накопления типа заболевания Тея — Сакса (гл. 2)) и уже можем предсказать, что многие заболевания, причины которых еще не выяснены (шизофрения, депрессия и т. д.), имеют генетическую природу.

Электропласты электрической рыбы: синаптическая модель

Существенную зависимость научного прогресса от модельных систем можно показать на системе медиатор — рецептор. Понятие «рецептор» долгое время являлось функциональным описанием, не имеющим молекулярной основы. Успех нейробиологии связан с выделением и химической характеристикой рецепторного белка (гл. 9). В основном это обусловлено выбором идеального материала для модели синаптической передачи нервного импульса: электрической ткани электрического угря (*Electrophorus electricus*) и различных видов электрического ската (*Torpedo*) (рис. 12.8 и 12.9).

Электрические органы этих рыб состоят из стопок клеток, похожих на серию батарей, называемых электроплаксами (или электрическими пластинками). Они способны создавать на клеточной мембране потенциал ~ 70 мВ (отрицательный потенциал внутри клетки), который падает во время нервного импульса в результате открывания Na^+ , K^+ -каналов мембраны электроплаксов. Медиатором в этой системе является ацетилхолин, а постсинаптический рецептор — это, следовательно,

ацетилхолиновый рецептор. Электроплакс происходит из мышечной клетки (онтогенез) и, хотя уже не имеет сократительного механизма, подобен ей во многих аспектах. Клетка электроплакса [13] представляет собой большой синцитий $10 \cdot 10 \cdot 0,01$ мм, образующийся из многочисленных клеток: он содержит >1000 клеточных ядер. Потенциал, производимый 400—1000 единичными клетками в стопках электрического органа *Torpedo*, соединенных последовательно, достигает на воздухе 40 мВ. Несколько сотен таких клеточных колонок, соеди-

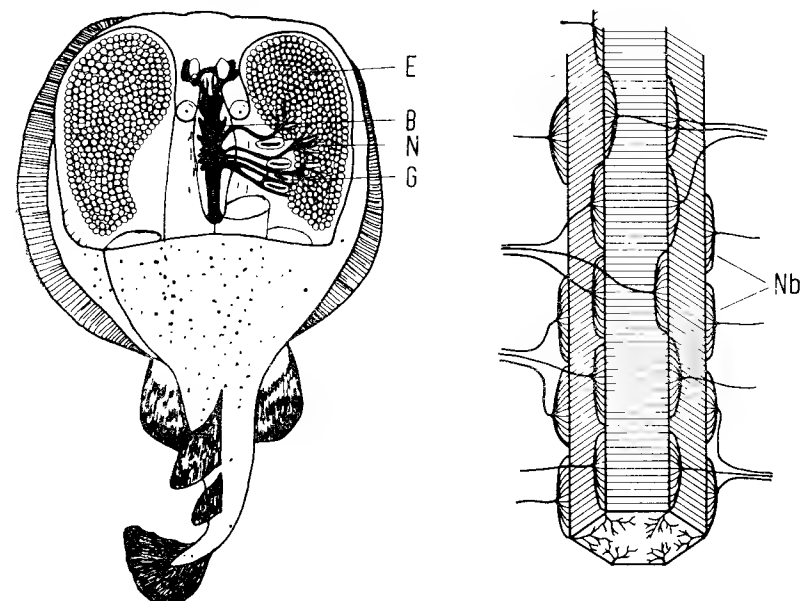


Рис. 12.8. Электрический орган электрического ската (*Torpedo*). Модельная система для биохимического изучения синаптической функции. Никотиновый ацетилхолиновый рецептор был первым рецепторным белком, выделенным из этой ткани и ставшим, таким образом, доступным для исследования биохимическими методами. а — *Torpedo*: электрический орган (E), нерв (N), мозг (B), жабра (G); б — стопка шестигранных клеток электроплаксов электрического органа; пучок нервов (Nb), который иннервирует клетки со стороны брюшка и синхронизирует разряд.

ненных параллельно, производят импульсный электрический ток до 50 А и могут быть использованы в качестве оружия (типа электрической дубинки) для того, чтобы парализовать жертву. Электроплаксы электрического органа угрей упакованы от головы к хвосту; их размеры $3 \cdot 2 \cdot 0,5$ мм. Каждые 5000 образуют колонку и до 60 колонок соединены в батарею с напряжением 600 В и силой тока 0,5 А. Синапсы составляют 2% иннер-



вированной клеточной поверхности электрических угрей и 50% поверхности *Torpedo*.

Таким образом, электрический орган представляет собой идеальный объект для нейрохимического исследования, поскольку он состоит из большого числа одинаковых клеток, иннервированных только одним типом синапса. В частности, морская рыба *Torpedo* имеет такую плотную иннервацию, что иннервированная мембрана (только ventralная сторона клетки иннервирована) состоит преимущественно из рецепторного белка. Из *Torpedo* удалось выделить рецептор в количестве 100 мг. Электрический угорь также является хорошим источником выделения рецептора. У этой пресноводной рыбы разряд электроплаксов происходит не через деполяризацию медиатора, как в *Torpedo*, а в основном посредством генерации потенциала действия. Именно поэтому электрическая ткань угря используется также для исследования ионных каналов, генерирующих потенциалы действия (электроплаксы *Torpedo* не генерируют потенциалы действия).

Нервномышечная передача электрической рыбы исследовалась на четырех уровнях: на интактном органе, на отдельном электроплаксе, на изолированных фрагментах постсинаптических мембран и синапсоммах, а также на очищенном рецептор-

Рис. 12.9. «Рецепторная модель» *Torpedo*: от организма к молекуле. Электрическая ткань электрической рыбы, первоначально рассматриваемая как богатый источник ацетилхолинэстеразы, а затем как модельная система для исследования нейромусcularной передачи. а — *Torpedo californica*; б — электрическая ткань в поперечном сечении. В центре микрофотографии видна единичная клетка электроплакса, также называемого электроцитом, которая иннервируется на ventralной поверхности (внизу); dorsalная поверхность электроплакса (вверху) имеет много каналоподобных впячиваний на плазматической мембране. Тогда как плазматическая мембрана иннервированной поверхности плотно заполнена никотиновыми ацетилхолиновыми рецепторами, dorsalная поверхность содержит АТРау, необходимую для удаления катионов, попадающих в клетку при возбуждении; в — то же, что и б, но при большем увеличении. Однако вверху находится ventralная поверхность электроплакса с нервными окончаниями (узнаваемыми по их синаптическим везикулам, содержащим медиатор ацетилхолин), а внизу — dorsalная поверхность следующего (соседнего) электроплакса с впячиваниями, содержащими АТРау. Светлая полоска в центре — межклеточное пространство, содержащее соединительную ткань; г — тонкий срез мембранного препарата, содержащего богатые рецептором мембраны, с иннервированной стороны электроплаксов. Эти мембраны образуют при гомогенизации ткани плотно слившиеся везикулы («микромешочки»), которые напоминают исходные постсинаптические мембраны по их способности пропускать катионы только после возбуждения агонистом; д — сильно увеличенное изображение поверхности везикулы богатой рецептор мембраны (как и на г). При таком увеличении можно видеть единичные рецепторные молекулы. Впервые выделение чистого рецепторного белка из электрической ткани было выполнено в 1972 г. в нескольких лабораториях. Электронные микрофотографии б—г приводятся с разрешения С. Рейнгардта [Reinhardt S., Diplomathezes, Berlin, 1983]; д — [Schiebler, Hucho, Eur. J. Biochem., 85, 55—63, (1978)].

ном белке (гл. 9); этим занимались группы Шанже во Франции, Уиттейкера в Англии и Германии, Рафтери, Карлина и их коллег в США. Биохимическая часть этих исследований, т. е. мембранный и белковый уровень, рассматривалась в гл. 8 и 9.

E. coli нейробиологии — клеточные культуры

Клеточные культуры имеют общее свойство с бактериальными культурами, а именно: они представляют собой клетки одного типа. Бактериальная культура в микробиологии (штамм) соответствует клеточной линии (клон) клеточной биологии. Сегодня клеточная биология играет все возрастающую роль как определенная, удобная для работы, воспроизводимая модельная система для исследования специфических функций клеток эукариот. Такие системы имеют много достоинств, мы же упомянем только два, которые и обусловили преимущественное использование клеточной культуры, а не целого организма животного или его органа. Во-первых, как и культуры бактерий, некоторые из них способны пролиферировать таким образом, что особые и редкие типы клеток делаются вполне доступными для биохимического изучения. Во-вторых, их можно быстро получить, т. е. интересующая стадия метаболизма или развития клетки данного типа может быть выявлена и изучена более эффективно в клеточной культуре, чем при выделении клетки из целого организма или отдельного органа.

Клетки можно культивировать либо после извлечения из органа при перфузии, например коллагеназой, либо клонированием, т. е. воспроизводством единичной клетки. Первый метод все еще не дал удовлетворительных результатов. Получение клеточных линий из единичных нервных клеток оказалось очень успешным [10]. Такие клеточные линии и опухолевые клетки возникают только из клеток на ранней стадии развития, поскольку зрелые дифференцированные нейроны не делятся. В частности, клетка нейробластомы опухоли мыши (С 1300), открытая в 1940 г. и затем воспроизведенная как перевиваемая опухоль, была клонирована в 1969 г. и с тех пор стала классической модельной системой.

Клетки нейробластомы имеют важные свойства, типичные для нервных клеток: они электрически и химически возбудимы и имеют ионные каналы и рецепторы; они обладают ферментативным аппаратом для синтеза медиаторов, а также системой, необходимой для их инактивации, т. е. инактивирующими ферментами, такими, как ацетилхолинэстераза или транспортные системы для поглощения высвобождающихся катехоламинов; они образуют отростки, подобные нервным волокнам. По мере того как они растут и делятся в культуре, можно исследовать

биогенез этих свойств, момент их появления в клеточном цикле и регуляцию (гл. 11). Изучались дифференциация нервной клетки до стадии прекращения деления; сигналы, запускающие дифференциацию; взаимодействие с другими клетками — глияльными и мышечными; образование синапса; влияние гормонов, лекарств, а также патогенных бактерий и вирусов; проблемы питания; изменения, вызванные длительной стимуляцией. Некоторые результаты экспериментов уже упоминались в связи с возникновением и специфичностью синаптических контактов (гл. 8, 11), развитием возбудимости (гл. 11), проблемой опиатов и их свойств (привыкание и переносимость). Более подробную информацию можно получить из обширной специальной литературы.

Заслуживает внимания еще особенно полезная клеточная линия — линия клеток РС 12, клонированная из феохромоцитомы — опухоли хромаффинной ткани надпочечника. Клетки РС 12 аналогичны хромаффинным клеткам по их способности синтезировать, запасать и высвобождать катехоламины. Подобно не нейрональным клеткам, они размножаются, но под действием NGF они перестают делиться, участвуют в нейритных процессах и становятся очень похожими на симпатические нейроны. Они приобретают электрическую возбудимость, отвечают на ацетилхолин и даже образуют функциональные холинэргические синапсы. Клетки РС 12 используются в качестве модельных систем для изучения дифференциации нейронов, действия гормональных и трофических факторов, функции и метаболизма гормонального рецептора (см. с. 325).

Генная инженерия совершила революцию в нейрехимии

Эта глава книги «Нейрехимия» (а значит, и вся книга) была бы неполной, если бы я не описал кратко огромные возможности и некоторые первые успехи метода клонирования. Место, ~~уделяемое~~ ^{уделяемое} генной инженерии в книге, ни в коем случае не следует соотносить с его значением для нейрехимии. Напротив, роль, которую молекулярная генетика, методы рекомбинантных ДНК и клонирования (молекулярного и клеточного) будут, по-видимому, играть в будущем, представляется мне очень важной. Для детального рассмотрения генной инженерии необходим был бы целый дополнительный том, поэтому здесь это сделано лишь в общих чертах. (Пока такого тома еще нет, я должен отослать читателя к публикациям по молекулярной биологии.)

Проникновение молекулярной генетики в нейрехимию сравнимо с применением электроники и электронной микроскопии в естествознании. И это не преувеличение. Позвольте обосно-

вать такое замечание. Идентификация, выделение и биохимическая характеристика нейропептидов из мозга млекопитающих в последние годы развивались особенно активно. Однако один гипоталамус крысы содержит, например, только фемтомольные количества гормонов — регуляторов высвобождения фактора роста (соматолиберин; GRF) или фактора высвобождения кортикотропина (кортиколиберин; CRF). Последний был недавно выделен в чистом виде из гипоталамуса 60 000 крыс, и его первичная аминокислотная последовательность была определена самыми современными методами микросеквенирования. Анализ многих тысяч известных и еще неизвестных пептидов и белков мозга, таким образом, был бы почти безнадежной задачей. Но с помощью методов генной инженерии она становится реально выполнимой.

Короче говоря, необходимо только несколько микрограммов мРНК в виде смеси, присутствующей в ткани, продуцирующей искомым белок. Из этой смеси разных молекул мРНК можно выделить или частично очистить только одну, несущую информацию о данном белке. Соответствующая копия ДНК (кДНК) различных мессенджеров продуцируется с помощью обратной транскриптазы; молекулы кДНК включаются в вектор (плазмиду) посредством целого ряда ферментативных стадий, которые сложны, но уже хорошо изучены и могут быть выполнены в лаборатории, специализирующейся в области молекулярной биологии. Плазида — фактически популяция плазмид, причем каждая содержит одну особую встроенную мРНК, вводится в бактерии. Следует заметить, что в каждую бактерию встраиваются различные плазмиды (т. е. различные кДНК, комплементарные различным мРНК). Теперь уже действительно имеет место «клонирование»: потомство одной отдельной бактерии — клон, поэтому следует отобрать клон, продуцирующий нужный белок. Это наиболее трудоемкая и сложная часть работы. Трудоемкая, поскольку необходимо проверить десятки и сотни клонов, сложная, так как, если продукт трансляции кДНК в плазмиде не является ферментом или гормоном, активность которых легко тестировать, следует применять более сложную методику. Еще одной сложностью при идентификации искомого продукта трансляции является появление неактивного продукта трансляции в отсутствие посттрансляционного процессинга, который не может произвести бактерия.

Приходится удовлетвориться продуктом транскрипции — кДНК. Его можно продуцировать в больших количествах при росте клона и секвенировать по методу Максама — Гилберта или по методу Сенгера. Из нуклеотидной последовательности можно вывести аминокислотную последовательность. Конечно, первичная структура искомого белка, полученная таким путем,

может быть предшественником и представлять собой просто аминокислотную последовательность без возможных углеводных, ацетильных, метильных или фосфатных групп, необходимых для проявления активности. Если клонирован непосредственно ген, кодирующий нужный белок (не через мРНК — кДНК), он может даже содержать интроны, которых нет в конечном продукте гена.

Мы уже видели в предыдущих главах этой книги некоторые применения методов рекомбинантной ДНК в нейрехимии. Одним из наиболее впечатляющих успехов является определение природы опиоидных пептидов, идентификация трех предшественников энкефалинов, динарфина и ряда пептидных гормонов (гл. 8). Другим примером является клонирование четырех различных полипептидных цепей никотинового ацetylхолинового рецептора (гл. 9). Их последовательности, выведенные из соответствующих кДНК, сейчас известны. Более того, активный рецептор был экспрессирован из кДНК в ооцитах лягушки *Xenopus* — еще одной модельной системы, очень важной для нейрехимики.

Клонирование гибридом для получения моноклональных антител

Линия гибридных клеток не истинно нейрональная модельная система, однако она должна быть упомянута здесь, поскольку представляет собой полезный инструмент исследования в нейрехимии. Каждый В-лимфоцит обычно секретирует только один тип антител. Смесь большого числа моноспецифических антител образует нормальную гетерогенную антисыворотку. Для получения высокопродуктивных моноспецифических лимфоцитов, секретирующих антитела, Келер и Милштейн проводили слияние В-клеток иммунной мыши с опухолевыми клетками. В отличие от нормальных лимфоцитов, полученные гибридные клетки растут и размножаются практически бесконечно и продуцируют смесь антител против антигена, используемого для иммунизации. Даже если антиген является индивидуальным белком, продуцируемые антитела представляют собой смесь многих антител, каждое из которых направлено против одного специфического антигенного участка исходной молекулы. Для получения моноспецифической сыворотки, т. е. раствора антител против одной антигенной области и происходящих из одного вида гибридных клеток, эти клетки необходимо отобрать и «клонировать». Теперь клон продуцирует «моноклональные антитела», гомогенную популяцию антител против только одной детерминанты антигена. Эти моноклональные антитела можно использовать для разнообразных исследований, например для идентификации функциональных участков молекулы. Но что еще более важно, такой метод может использоваться для полу-

чения антител против еще неочищенного белка. Далее из смеси лимфоцитов, полученных против неочищенной белковой фракции, может быть отобрана и клонирована гибридная линия, специфичная к искомому белку. Моноклональные антитела в свою очередь можно использовать для выделения мРНК, кодирующей данный белок: образующийся в процессе трансляции в полисомах белок можно осадить антителами. Осадок наряду с белком и рибосомами содержит в своем составе мРНК, связанную с рибосомами. Наконец, полученную таким образом мРНК, можно использовать для клонирования описанным выше способом посредством синтеза кДНК.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Katz B., Nerve, Muscle and Synapse, McGraw-Hill, Inc., New York, 1966.
2. Kuffler S. W., Nicholls J. G., Martin A. R., From Neuron to Brain, 2nd edition, Sinauer Assoc., Inc. Publishers, Sunderland, 1984.
3. Kandel E. R., Cellular Basis of Behavior, W. H. Freeman and Company, San Francisco, 1976.
4. Koshland D. E., Bacterial chemotaxis in relation to neurobiology. Ann. Rev. Neurosci., 3, 43—75 (1980).
- 4a. Koshland D. E.: The bacterium as a model neuron, TINS, 6, 133—137, 1983.
5. Ehrman L., Parsons P. A., The Genetics of Behavior, Sinauer Assoc., Inc. Publishers, Sunderland, 1976.
6. Jaenicke L. (ed.), Biochemistry of Sensory Function, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1974.
7. Gierer A., Biological features and physical concepts of pattern formation exemplified by Hydra, Curr. Top. Develop. Biol., 11, 17—59 (1977).
8. Schaller H. C., Rau T., Bode H., Epithelial cells in nerve-free hydra produce morphogenetic substances, Nature, 283, 589—590 (1980).
9. Sotelo C., Mutant mice and the formation of cerebellar circuitry, TINS, 3, 33—36 (1980).
10. Haffke S., Seeds N. W., The E. coli of neurobiology?, Life Sci., 16, 1649—1658 (1975).
11. Hamprecht B., Glaser T., Reiser G., Bayer E., Propst F., Hallermayer K., Culture and characterisation of hormone-responsive neuroblastoma x glioma hybrid cells, Meth. Enzymol., 109, 316—341 (1985).
12. Patrick J., Heinemann S., Schubert D., Biology of cultured nerve and muscle, Ann. Rev. Neurosci., 1, 417—443 (1978).
13. Changeux J. P., The acetylcholine receptor: and «allosteric» membrane protein, Harvey Lect., 75, 85—254 (1981).
14. Eccles J. C., The Understanding of the Brain, 2nd edition, McGraw-Hill Inc., New York, 1977.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА

- Spitzer N. C., Neuronal Development, Plenum Press, New York, London, 1982.
- Molecular Neurobiology, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 48, 1983.
- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. D., Molecular Biology of the cell, Garland Publishing Inc., New York, London, 1983.
- McKay R. D. G., Molecular approaches to the nervous system, Ann. Rev. Neurosci., 6, 527—546 (1983).
- Dudai Y., Genes, enzymes and learning in Drosophila, TINS, 8, 18—21 (1985).
- См. также работы [2, 4, 5, 12] в разд. Цитированная литература.

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

- Агонисты β-адренэргические 273, 299
- Аденлатциклаза 18, 271
- ингибирование 278, 281
- опиатами 290
- рецепторы β-адренэргические, стимуляция 277
- ADP 219
- Адреналин 220 сл., 269, 273, 297
- и обучаемость 349
- регуляция фосфорилирования сAMP 274
- Адренэргические клетки 321
- Аксон 24, 27, 34, 46, 93, 331
- кальмара 110, 116, 158, 167
- Аксональный транспорт, методы изучения 304
- — модель 309
- — селективность 309
- β-Аланин как нейромедиатор 231
- Алцгеймера болезнь 354
- Амакриновые клетки 20
- γ-Аминомасляная кислота (GABA) 121, 195, 250
- антагонисты 231
- как нейромедиатор 212, 229
- метаболизм и цикл Кребса 229
- транспорт 306
- Амнезия 338
- антероградная 338
- и гиппокамп 338
- ретроградная 338
- AMP 219, 347
- сAMP 272, 322, 348
- гидролиз 276
- регуляция фосфорилирования 274
- Амфетамин 285
- и обучаемость 349
- Анемонотоксины (ATX) 148
- Антиацетилхолинэстеразы
- и обучаемость 349
- Арабинозилцитозин 340
- Арахидоновая кислота 44
- Аспарагин 58
- Аспарагиновая кислота как нейромедиатор 232
- Астроциты 32
- Атропин 251
- АТР 94, 198, 219, 307
- АТРаза 76, 154, 160, 171 сл.
- ингибирование 176
- в липидных везикулах 179
- Аутоиммунные заболевания 105, 354
- Афферентные волокна 25, 331
- Ацетилкофермент А 44, 195
- Ацетилхолин 120, 160, 193, 195 сл., 222, 227, 261, 297, 321
- в электроплаксе 364
- и обучаемость 349
- как нейромедиатор 213
- регуляция системы сGMP 276
- транспорт 306, 309
- Ацетилхолиновый рецептор 203, 328, 354
- в электроплаксе 364
- и α-нейротоксины 210
- мускариновый 268
- никотиновый 79, 88, 210, 214, 243, 257 сл.
- агонисты и антагонисты 203
- и α-бунгаротоксин крайта 210
- сенсibilизация 299
- Ацетилхолинэстераза 160, 199, 201, 205, 328, 368
- ингибиторы 207, 267
- Бактериородопсин 88, 183
- Барбитураты 292
- Батрахотоксин (BTX) 148
- Белки нейронспецифические
- S-100 315
- 14-3-2 315
- P-400 315
- Белки, связанные с микротрубочками (MAP) 311
- G-Белок 18, 43
- N-Белок 18, 43
- Белок сборки тубулина (TAP) 311
- Бенздиазепины 292
- антагонисты 293
- Биполярные клетки 20
- Блокаторы трансляции и обучаемость 341
- Блокаторы, α и β 221
- Болезни генетические, Гоше 55
- — Нимана — Пика 55
- — Тей — Сакса 54
- — Фабри 56
- Болезнь Паркинсона 280, 285
- ДОРА-терапия 286
- α-Бунгаротоксин 322, 328
- крайта 210
- Бутирофеноны и допаминэргическая система ЦНС 281
- Ванна Ленгмюра 86
- Везикулы 218
- Вератридин 148
- Вещество Р 237, 297
- Витамины А 10
- альдегид (ретиный) 9, 33
- Возбуждающий постсинаптический потенциал (e. s. p. s.) 115, 120
- Вольфграма белки 99, 102

- Галактоза 356
 α-Галактозидаза 56
 Галактозилцереброзид 100
 Галактоцерамид (цереброзид) 62
 Ганглии симпатические 321
 Ганглиозиды 37, 45, 62, 99
 метаболизм 48
 номенклатура 49
 Тей — Сакса (G_{m2}) 55
 Ганглионарные клетки 20
 крыс 321
 Гель-фильтрация 86
 Гель-хроматография 249
 Гематоэнцефалический барьер 32
 Гемихолиний 196, 209
 Гиппокамп 337, 340
 Гистамин 250
 Глиальные клетки 29
 хелперные функции 329
 Гликозиды, ингибирование Na,K-АТРазы 176
 Гликозилтрансферазы 48
 Гликолипиды 36, 57
 Гликопротеины 38, 46
 строение 58
 функции 59
 Глицеро-3-фосфат 62
 Глицин как нейромедиатор 231
 Глутамат 251
 Глутаминовая кислота как нейромедиатор 232
 Глюкоцереброзидаза 55
 Гольдмана уравнение 114
 Горизонтальные клетки 21
 Грайяноксин (GTx) 148
 Гуанидилнуклеотиды 273
 cGMP 17, 33, 44, 275
 Дальтонизм 19
 Дендриты 24, 34, 37, 331
 Детергенты 81, 142, 242
 додецилсульфат натрия (ДСН) 242
 ионные 242
 неионные 242
 третон X-100 242
 Диализ 249
 Диацилглицерин 43
 Дигидроксифенилаланин (ДОФА) 286
 и болезнь Паркинсона 286
 Диизопропилфторофосфат, инактивация ферментов 207
 Диэтиламид лизергиновой кислоты (LSD) 226, 296
 ДНК 7
 ингибиторы синтеза 340
 Допамин 212 сл., 226, 286
 и обучаемость 349
 регуляция фосфорилирования cAMP 274
 Допаминэргическая система ЦНС 280
 Изопреналин 271
 Ингибирование
 постсинаптическое 121
 пресинаптическое 122
 Ингибиторный постсинаптический потенциал (i. p. s. p.) 115, 120
 Инсулин, рецепторы 299
 Каиновая кислота 296
 как антагонист 232
 Калпаин 340
 Кальмодулин 313
 Кальцинейрин 314
 Кальция ионы 360
 влияние на липидные мембраны 75
 в химической синаптической передаче 100
 и развитие миотрубочек 328
 Карбоангидраза 100
 Катехоламины и допаминэргическая система ЦНС 281
 — и обучаемость 349
 — как нейромедиаторы 216 сл.
 — рецепторы 243
 — транспорт 306
 Кеппинг 298
 Колбочки 10, 14, 21, 241
 Коллатерали 25
 Колхицин, ингибирование аксонального транспорта 308
 Конвульсанты хлоридзависимые 292
 Корсакова синдром см. Амнезия
 Кребса цикл, связь с метаболизмом GABA 229
 Крейцфельда — Джакоба болезнь 107, 354
 Куру 106
 Ландри — Гуилля — Барре синдром 106
 Лейкодистрофия Креббе 107
 Лизолецитин 72, 81
 Липидные везикулы 67, 74
 Липидный бислой 67
 Липиды 36
 миелина 97 сл.
 Липопротеины 81
 Липосомы 67, 74, 102
 Мальтоза 356
 Медиаторов агонисты 247

- антагонисты 247
 Медленные вирусные инфекции 106
 Мезокортикальная система 280
 Мембраны модель Даниелли и Давсона 68, 95
 — — «жидкомозаичная» Синдера и Никольсона 70
 Метахроматическая лейкодистрофия 107
 Миастения 105, 354
 и миелин 354
 Миелинизация 93
 Микроглиальные клетки 31
 Миниатюрный потенциал концевой пластинки (m. e. p. p.) 122
 Миобласты 328
 Миотрубочки 328
 Михаэлиса — Ментен теория 246
 Мицеллы 67
 Моноаминоксидаза (МАО) 222 сл.
 Морфин 287
 Наркомания, молекулярный механизм 290
 Нейробластома 31, 368
 и глиома 31, 329
 опухоли мышц 368
 Нейроглиа 29
 Нейропептиды 215
 Нейротоксины 210
 α 210, 261
 — кобры 210
 — эрабуксин морской змеи 210
 β 210
 Неокортекс 337
 Никотин 251
 Норадреналин 212 сл., 250, 269, 273, 285, 297, 321
 и обучаемость 349
 Обучаемость, адаптация 336
 — депрессия 336
 — «динамическая» гипотеза 334
 — и РНК 341
 — модель, моллюск *Aplysia californica* 337
 — пластичности гипотеза 334
 — потенцирование 336
 — — долговременное 338
 — привыкание 336
 — сенсибилизация 336
 — условный рефлекс 336
 Олигодендроглиальные клетки 31, 46
 Опсин 10, 33
 Палочки 10, 14, 21, 241
 Память долговременная 335
 — — и белок S-100 344
 — — кратковременная 335
 Перехват Ранве 26, 91
 Пероксидаза 199
 Петч-кламп (метод локальной фиксации) 123
 Петчинг 298
 Плазмалоген 40
 Потенциал действия 115, 145, 163, 322
 Прокаин 155
 Пропранолол 271, 299
 Протеинкиназа 99
 cAMP-зависимая 273, 322, 347
 ингибитор 347
 кальций-кальмодулинзависимая 274
 Протеолипиды 101, 103, 179
 Протонных насосов модели, конформационная гипотеза 180
 — — — хемиосмотическая гипотеза (Митчелла) 180
 — — — химическая гипотеза 180
 Пуркиньи клетки 331
 Пуромидин 341
 Рассеянный склероз 105, 354
 Рефлекс втягивания жабр 348
 Рецептивное поле 21
 «Рецепторная модель» Torpedo 367
 Рецепторные клетки 20
 Рецепторный потенциал 16, 115
 Рецепторы
 α и β 221
 β-адренэргические 299
 инсулина 299
 серотонина 296
 глутамата 296
 GABA 292
 глицериновые 292
 допаминные 281
 серотонина 296
 опиатные 233
 Рибоза 356
 РНК и обучаемость 341
 Родопсин 9, 33, 88
 Сакситоксин (STX) 146
 блокировка калиевых каналов 118
 меченный тритием 141
 Селективной стабилизации синапсов гипотеза 330
 Серого бугра и гипоталамуса система 280
 Серотонин 250, 297, 347
 регуляция фосфорилирования cAMP 274
 рецепторы 296

- и LSD 296
- синтез 226
- Синапс 26
 - адренэргический 221, 321
 - аксо-аксонный 28
 - аксо-дендритный 28
 - аксо-соматический 28
 - возбуждающий 187
 - нейромышечный 331
 - тормозной 187
 - химический 120, 189, 329
 - холинэргический 193 сл., 221, 297, 321
 - мускариновый 193, 257
 - никотиновый 193, 195, 257
 - электрический 120, 189
 - коннексины 189
 - коннексоны 189
- Синаптические везикулы 321
 - и химический синапс 190
- Синаптические комплексы 190
- Синаптосомы 190, 196
- Скополамин, ингибирование обучаемо-
сти 349
- Сомы 24, 34
- Сперри гипотеза (теория программи-
рования) 330
- Стерины 36
- Стрихнин 294
- Сульфатид 101
- Сфингозин 62
- Сфинголипидозы 53, 62, 106
- Сфинголипиды 45
 - биосинтез 62
 - функции 50
- Сфингомиелин 55, 62, 76, 101
- Сфингомиелиназа 100
- Таурин как нейромедиатор 231
- Тетраэтиламмоний (ТЭА), блокиров-
ка калиевого канала 118, 156
- производные 156
- Тетродотоксин (ТТХ) 146, 307, 322
 - блокировка натриевых каналов 118, 133
 - меченный тритием 141
- Тиоксаптен и допаминэргическая си-
стема ЦНС 281
- Тирозингидроксилаза 216, 321
- Токсин ботулинический 51, 209, 265
 - дифтерий 53
 - и N-белки 279
 - коклюша 279
 - скорпиона 150
 - столбняка 51
 - холеры 52, 279
- Трансдуция 18
- Трофизм 319
- Трофические факторы 349
- Тубулин, структура 311
- фосфорилирование 311
- Ультрафильтрация 249
- Ультрацентрифугирование 249
- Фактор адгезии 318
- Фактор роста нерва (NGF) 322, 325 сл.
- Фенилаланин 107
- Фенилаланингидроксилаза 107
- Фенилкетонурия 107
- Фенилэфрин 271
- Феноксibenзамин 271
- Фенотиазины и допаминэргическая си-
стема ЦНС 281
- «Флип-флоп» 74
- Фодрин 340
- Фосфатаза 100
- Фосфатидилинозит 40, 101
- Фосфатидилсерин 38, 62, 76, 100, 175
- Фосфатидилхолин (лецитин) 39, 62, 76, 81, 97, 101, 195
- Фосфатидилэтаноламин 39, 62, 76, 101, 195
- Фосфодиэстераза (PDE) 17, 100
 - гидролиз cAMP 276
- Фосфолипазы 43
- Фосфолипиды 38, 81, 99, 175
 - биосинтез 62
 - метилирование 39
- Фосфорилхолин 55, 62
- Фоторецепции модель Хагинса 19
- Хвостатое ядро 280
- Хемотаксис 331, 354
 - в бактериях 356
 - рецепторы 256
 - в нематодах 359
- Хлорпромазин 155
- Холестерин 44, 71, 73, 81, 95, 101
- Холестеролацетилтрансфераза 100
- Холин 195 сл.
- Холинэргические клетки 321
- Хромаффинные гранулы 218
- Хромаффинные клетки 369
- Хромогранины 219
- Церамид 45, 55
 - тригексоид 56
- Цереброзиды 45, 62, 99, 101
- Циклогексимид 341
- Черная липидная мембрана 86
- Черного полосатого тела система 280
- Черное вещество 280
- Чечевицеобразное ядро 280

- Шванновские клетки 31, 93
- Эндорфин 287
- Энкефалины 233, 287, 297
 - аминокислотная последователь-
ность 234
 - пресинаптическое ингибирование 290
- Эргоалкалоиды и допаминэргическая
система ЦНС 281
- Эфферентные волокна 25
- Экспериментальный аллергический
неврит (ЭАН) 105
- Экспериментальный аллергический эн-
цефаломиелит (ЭАЭ) 105
- Электротонический потенциал 115
- Энграм 334, 346
 - методы исследования 340
 - природа 334

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие к русскому изданию	5
Предисловие	6

Глава 1 ОПРЕДЕЛЕНИЕ НЕЙРОХИМИИ НА ПРИМЕРЕ ЗРИТЕЛЬНОГО ПРОЦЕССА

Биохимическими методами можно изучать механизм переноса информации, но не саму информацию	7
Нейрохимия сетчатки не описывает процесс видения изображений	9
Первая стадия: витамин А-альдегид поглощает свет	9
Вторая стадия: запуск нервного импульса (трансдукция)	13
Родопсин подвергается фотофосфорилированию	19
Колбочки и цветовое зрение	19
Беспозвоночные видят иначе	20
Третья стадия: интегрирование нервных импульсов	20
Нейрохимия как интегральная наука	23
Нейрон: его функциональные элементы как предмет нейрохимии	24
Выводы	33
Цитированная литература	34
Дополнительная литература	34

Глава 2 МОЛЕКУЛЫ МЕМБРАН

Предмет нейрохимии шире, чем просто химия «нейромолекул»	35
Липиды, белки и углеводы — строительные блоки мембран нервных клеток	36
Принципы структурной организации фосфолипидов обуславливают большое разнообразие их молекулярных структур	38
Фосфолипазы инициируют деградацию фосфолипидов	43
Сфинголипиды не только присутствуют в нервных клетках, но и играют в них исключительно важную роль	45
Соображения о возможных функциях сфинголипидов	50
Ганглиозиды — рецепторы бактериальных токсинов	51
Липидозы обусловлены дефектами ферментов метаболизма гликолипидов	53
Углеводы придают специфичность поверхностям клеток; гликопротеины	57
Гликопротеины важны для специфичности формирования нервных связей	59
Выводы	61
Цитированная литература	63
Дополнительная литература	64

Глава 3 МЕМБРАНЫ	65
Нейрональная мембрана является плазматической	65
От мембранных моделей Гортера и Гренделя до моделей Синджера и Николсона	66
Модели — не копии реально существующих структур	70
Свойства мембран и их липидной фазы взаимосвязаны	70
Биомембраны — «жидкокристаллические» структуры	70
Лизолецитин повреждает мембраны	72
Мембраны, содержащие холестерин, не являются ни кристаллическими, ни жидкокристаллическими	73
Лекарственные препараты влияют на текучесть мембраны	73
Влияние ионов на липидные мембраны	74
Асимметрия биологических мембран	75
Углеводы и белки также распределены в бислой асимметрично	76
Липид-белковые взаимодействия приводят к разделению фаз и асимметрии мембраны	79
Белки липидного обмена	81
Мягкие детергенты могут замещать липиды мембран	81
Искусственные липидные мембраны — модели биологических мембран	83
Выводы	88
Цитированная литература	89
Дополнительная литература	90

Глава 4 МИЕЛИН	91
Функции миелина. 1. Изоляция; ускорение проведения импульса	91
Функции миелина. 2. Экономия пространства и энергии	93
Миелин — компактная спираль из плазматической мембраны	94
Бислойная структура миелина	95
Химический состав миелина	97
Миелин целиком не метаболизирует	101
Белки с неизвестной функцией	101
Экспериментальная аутоиммунная болезнь: модель рассеянного склероза?	105
Болезни, обусловленные дефектами миелина	106
Выводы	107
Цитированная литература	108
Дополнительная литература	109

Глава 5 ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЯ	110
Потенциал покоя	110
Возбуждение нейрона: локальный потенциал и потенциал действия	115
Передача синаптического сигнала	119
Одиночные каналы и метод шумового анализа: электрофизиология на молекулярном уровне	123
Выводы	127
Цитированная литература	129
Дополнительная литература	129

Глава 6 ИОННЫЕ КАНАЛЫ	130
Активный и пассивный ионный транспорт независимы	130
Химическая и электрическая регуляция пассивных ионных токов	132

Пассивный транспорт ионов Na^+ не зависит от транспорта ионов K^+	132
Воротный механизм и селективный фильтр — функциональные элементы ионных каналов	133
Натриевый канал: воротный механизм	134
На порог возбуждения влияют ионы кальция, а не Mg^{2+}	135
Натриевый канал: селективный фильтр	135
Канал или переносчик?	138
Некоторые физические свойства натриевого канала	140
Биохимическая характеристика натриевого канала	140
Влияние лекарственных препаратов на потенциал действия	145
Нейротоксины как инструменты исследования ионных каналов	146
Анестезия	152
Калиевый канал	155
Некоторые физические свойства калиевого канала	158
Биохимическая характеристика калиевого канала	159
Структура аксональной мембраны. Биохимия, электронная микроскопия, спектроскопия	159
Выводы	162
Цитированная литература	164
Дополнительная литература	165
Глава 7	
АКТИВНЫЙ ТРАНСПОРТ ИОНОВ	167
Три примера АТФ-зависимых ионных насосов	168
Натрий-калиевый насос	171
Насосы, транспортирующие заряды. Электрогенные насосы	175
Сердечные гликозиды ингибируют натрий-калиевый насос	176
Механизм транспорта Ca^{2+}	177
Протонный насос: синтез АТФ функционально противоположен активному транспорту	179
Модели протонных насосов	180
На что похож ионный насос?	182
Выводы	183
Цитированная литература	185
Дополнительная литература	186
Глава 8	
СИНАПС. ЧАСТЬ 1	187
Нейрон и синапс. Исторический очерк	187
Чем же интересен синапс?	187
Электрические и химические синапсы	188
Свойства электрического синапса	189
Химический синапс — место регуляции нервной системы	189
Холинэргические синапсы периферической и центральной нервной системы	193
Два класса холинэргических синапсов — мускариновый и никотиновый	193
Отдельные стадии химической синаптической передачи	194
Никотиновый холинэргический синапс	195
Холин реагирует с ацетилхолинэргическим А, образуя ацетилхолин	198
Ацетилхолин «упакован» в везикулы	198
Как же ацетилхолин попадает в синаптическую щель?	199
Экзоцитоз — эндоцитоз	199
Роль кальция	199
Ацетилхолин связывается с постсинаптической мембраной	200
Инактивация нейромедиатора посредством ферментативного гидролиза	201
	205

Ингибиторы отдельных стадий синаптической передачи	208
Нейротоксины ядов змей	209
Другие нейромедиаторы: критерии отнесения и классификация	212
Нейропептиды: медиаторы и гормоны	214
Нейромедиатор может проявлять несколько функций	214
Катехоламины	216
Синтез катехоламинов строго регулируется	216
Катехоламины также «упакованы» в везикулы	218
Высвобождение и связывание	220
Многочисленные рецепторы обеспечивают варибельность действия медиаторов	221
Различные типы адренэргических эффектов	221
Инактивация катехоламинов посредством поглощения и деградации	221
Серотонин	226
Синтез серотонина из триптофана и его деградация при помощи МАО	226
Цикл серотонина аналогичен циклам других нейромедиаторов	227
Аминокислоты-нейромедиаторы: ГАБА, глицин и другие	229
Ингибиторный медиатор — γ -аминомасляная кислота	229
ГАБА регулирует каналы хлор-ионов	230
Антагонисты ГАБА вызывают судороги	231
Глицин — еще один ингибиторный нейромедиатор	231
Глутамат и аспартат: возбуждающие нейромедиаторы	232
Киновая кислота и метод химических повреждений	232
Энкефалины и другие нейропептиды: нейромодуляторы и предполагаемые нейромедиаторы	233
Вещество Р — самый «старый» известный нейропептид	237
Выводы	237
Цитируемая литература	238
Дополнительная литература	240
Глава 9	
СИНАПС. ЧАСТЬ 2. РЕЦЕПТОРЫ	241
Рецепторы — физиологические центры действия	241
Три критерия, определяющие связывающий центр как рецептор	242
Три уровня исследования рецептора: данные должны коррелировать	242
Модели рецептора	243
Изучение связывания: связывание не тождественно биологическому действию	248
Методологические замечания: необратимое связывание, аффинное мечение	253
Мобильные рецепторы: гипотеза «плавающего рецептора»	255
Ацетилхолиновые рецепторы	257
Никотиновый ацетилхолиновый рецептор. Первый уровень: интактные клетки	257
Второй уровень: рецепторная мембрана	258
Третий уровень: молекулы рецептора	262
Фармакологическая десенситализация: модель модуляции синапса	263
Ацетилхолиновые рецепторы из мышечной ткани	264
Гиперсенситализация. Еще одна модель модуляции рецептора?	264
Фосфорилирование ацетилхолиновых рецепторов	266
Миастения — аутоиммунное заболевание никотинового холинэргического синапса	266
Мускариновый ацетилхолиновый рецептор	268
Катехоламиновые рецепторы	269
β -Адренэргические рецепторы: взаимодействие рецептора, циклазы и регулятора (R, C и N)	269

Гипотеза Грингарда: cAMP осуществляет регуляцию посредством фосфорилирования белка	273
Синапсин I — субстрат различных протеинкиназ	274
Циклические нуклеотиды и Ca^{2+} — два классических «вторичных мессенджера»	275
α -Адренэргические рецепторы (α -адреноцепторы)	277
Токсины как инструменты исследования. Токсины холеры и коклюша приводят к ADP-рибозилированию N-белков	279
Допаминовые рецепторы	279
Дофамин и шизофрения	284
Болезнь Паркинсона	285
Опиатные рецепторы	287
Пресинаптическое ингибирование опиатами	289
Привыкание к лекарствам и лекарственная зависимость. Молекулярная модель	290
Рецепторы GABA — ингибиторные и аллостерические белковые комплексы	292
Бензодиазепины и барбитураты аллостерически усиливают действие	293
Глициновые рецепторы также являются ингибиторными; они первыми выделены из центральной нервной системы	294
Глутаматные, серотониновые и многие другие интересные рецепторы еще не выделены	295
Ауторецепторы и некоторые замечания, касающиеся тонкой регуляции нервной активности	297
Рецепторы находятся под регуляторным контролем	298
Выводы	299
Цитированная литература	300
Дополнительная литература	302

Глава 10

ЦИТОПЛАЗМА НЕЙРОНОВ И НЕЙРОНСПЕЦИФИЧЕСКИЕ БЕЛКИ	303
Аксональный транспорт — внутриклеточная система коммуникации	303
Транспортируются все компоненты нервной клетки: белки, липиды, медиаторы, митохондрии и т. д.	306
Кинетика транспорта: скорости различных компонентов различны	307
Механизм: энергозависимый, связанный с мембранами и осуществляемый филаментными структурами	307
Тубулин и ассоциированные с ним белки	310
Нейрофиламенты	312
Актин, миозин: их роль в механической работе?	312
Кальмодулин — медиатор кальциевой регуляции	313
Нейронспецифические белки	314
Выводы	316
Цитированная литература	317
Дополнительная литература	317

Глава 11

РАЗВИТИЕ, СТАБИЛИЗАЦИЯ И ПЛАСТИЧНОСТЬ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ	318
Дифференциация нейромедиаторов	320
Межсинаптическая регуляция: ортоградная и ретроградная	321
Дифференциация ионных каналов и возбудимость	322
Имеются разнообразные программы клеточной дифференциации	323
Трофические факторы	323
Фактор роста нерва (NGF)	325
Молекула NGF	325

Механизм действия NGF неизвестен	326
NGF регулирует дифференциацию, выживание и рост нервных клеток в направлении мишени	327
Имеются ли другие факторы роста нерва?	327
Синаптогенез	328
Гипотеза «селективной стабилизации» синапсов	330
Пластичность	332
Структура и активность белка зависят от химического окружения	332
Биохимическая основа обучаемости	333
Обучаемость зависит от пластичности нервной системы	334
Примеры обучаемости	336
Область обучаемости	337
Посттетаническое расслабление — синаптическая «память»?	338
Локализация памяти с помощью ингибиторов	340
Без белкового синтеза нет и долговременной памяти	341
Поиск белков, специфичных для памяти: S-100 и другие белки	343
Общий или специфический эффект?	345
Сенситизация <i>Aplysia</i> — модель обучаемости с описанием состояний от поведения до молекулярных событий	346
Принимают ли участие в процессе обучения катехоламины, ацетилхолины и гормоны гипофиза?	348
Выводы	349
Цитированная литература	350
Дополнительная литература	351

Глава 12

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МОДЕЛЬНЫЕ СИСТЕМЫ	352
Хемотаксис	354
Модель поведения: парамеция	360
Модель биологии развития: гидра	360
Дрозофила	361
Генетика мутантных мышей как метод анализа двигательной активности	362
Электропласты электрической рыбы: синаптическая модель	364
<i>E. coli</i> нейробиологии — клеточные культуры	368
Генная инженерия совершила революцию в нейробиологии	369
Клонирование гибридом для получения моноклональных антител	371
Цитированная литература	372
Дополнительная литература	372
Предметный указатель	373

УВАЖАЕМЫЙ ЧИТАТЕЛИ

Ваши замечания о содержании книги, ее оформлении, качестве перевода и другие просим присылать по адресу: 129820, Москва, И-110, ГСП, 1-й Рижский пер., д. 2, издательство «Мир».

Научное издание

Фердинанд Хухо
НЕЙРОХИМИЯ
Основы и принципы

Заведующий редакцией академик О. А. Реутов
Зам. зав. редакцией Н. А. Козырева
Ст. научный редактор Т. И. Почкаева
Мл. научный редактор Н. П. Власова
Художник В. С. Потапов
Художественный редактор М. Н. Кузьмина
Технический редактор А. Л. Гуллина
Корректор С. А. Денисова

ИБ № 6763

Сдано в набор 30.11.89. Подписано к печати 20.03.90.
Формат 60×90¹/₁₆. Бумага типографская № 1.
Печать высокая. Гарнитура Литературная.
Объем 12,0 бум. л. Усл. печ. л. 24,0. Усл. кр.-отт. 24,0.
Уч.-изд. л. 24,56. Изд. № 3/6424. Тираж 6100 экз. Зак. 1481.
Цена 4 р. 30 к.

Издательство «Мир» «Союзэкспорткнига»
Государственного комитета СССР по печати.
129820, ГСП, Москва, И-110, 1-й Рижский пер., 2.

Московская типография № 11 при Государственном
комитете СССР по печати.
113105, Москва, Нагатинская ул., д. 1.